

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE LYON

Année 1966 - N° 24

TITRE DES THÈSES

PREMIÈRE THÈSE

ÉTUDE DU MÉTABOLISME ET DE
L'ÉLIMINATION DE LA CHLOROQUINE

Son passage à travers le Placenta

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ :
Études du mécanisme de la tératogenèse provoquée par
le Thalidomide

THÈSES

présentées

à la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon
et soutenues publiquement le 9 Mars 1966
pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie d'État

par

VO PHI HUNG

né le 7 Mars 1935

à BINH HOA XA (Sud-Vietnam)

Année 1966 - N° 24

TITRE DES THÈSES

PREMIÈRE THÈSE

ÉTUDE DU MÉTABOLISME ET DE
L'ÉLIMINATION DE LA CHLOROQUINE

Son passage à travers le Placenta

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ :
Études du mécanisme de la tératogenèse provoquée par
le Thalidomide

THÈSES

présentées

à la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon
et soutenues publiquement le 9 Mars 1966
pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie d'État

par

VO PHI HUNG

né le 7 Mars 1935

à BINH HOA XA (Sud-Vietnam)

Digitized by the Internet Archive
in 2026



FACULTE MIXTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE DE LYON

P E R S O N N E L de la F A C U L T E

Doyens Honoraires :

M. J. LEPINE - Membre de l'Institut
M. H. HERMANN - Correspondant de l'Institut

Doyen : M. J.F. CIER

Assesseurs : M. M. LEVRAT
M. L. REVOL

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. PATEL - LEPINE - TRILLAT - MOURIQUAND - GARIN - GATE - MARTIN -
GABRIELLE - SANTY - DUCLOS - GUILLEMINET - HERMANN - ROCHET -
POLLOSSON - WERTHEIMER - ENSELME

PROFESSEURS

MM. CIBERT	Clinique Urologique
PONTHUS (détaché à Beyrouth)	Physique biologique
DECHAUME	Clinique Neuro-psychiatrique et d'Hygiène mentale
CHAMBON	Chimie organique et toxicologie
PAUPERT-RAVAULT	Clinique médicale B
FROMENT	Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires
CROIZAT	Clinique médicale C
MALLET-GUY	Clinique chirurgicale A
REVOL	Pharmacie galénique
PIGEAUD	Clinique obstétricale
BOURRET	Médecine du travail
LEVRAT	Clinique médicale A
SOHIER	Hygiène et action sanitaire et sociale
NETIEN	Botanique et cryptogamie
BERTRAND	Clinique chirurgicale C
BADINAND	Chimie analytique pharmaceutique
DREVON	Pharmacie chimique et pharmacologie
ROCHE	Médecine légale et déontologie
COUDERT	Parasitologie et pathologie exotique

MM. MOUNIER-KUHN

PAUFIQUE
THIERS

BRUN
CREYSSEL

DARGENT
GUICHARD
GIRARD Paul
LATARJET
PEYCELON
GIRARD Marcel
VACHON

GALY
PAPILLON

JEUNE
GONIN

MONNET
BANSSILLON
CHATONNET

GUINET
TRILLAT
FREIDEL

MARION Joseph
DORCHE
DUMONT Louis
PERROT

CIER J. F.
PERRIN J.
MICHAUD Pierre
MATHIEU

FAUCON
BERTOYE
VIGNON

CIER André
VINCENT D.
X.....

X.....
X.....
X.....

Clinique d'Oto-rhino-laryngologie
et d'audio-phonologie
Clinique ophtalmologique
Clinique de dermatologie, syphiligraphie et
allergologie
Clinique de pneumo-phtisiologie
Clinique chirurgicale orthopédique et
traumatologique
Clinique carcinologique
Anatomie pathologique
Pathologie générale et expérimentale
Anatomie
Pathologie chirurgicale
Clinique médicale D
Pathologie médicale
Physio-pathologie des voies respiratoires
Radiologie
Clinique médicale infantile et hygiène du 1er âge
Thérapeutique
Bactériologie
Physiologie et pathologie obstétricales
Physiologie B
Clinique endocrinologique
Clinique de chirurgie orthopédique
Clinique stomatologique
Clinique de chirurgie et d'orthopédie infantiles
Matière médicale et législation pharmaceutique
Histologie et embryologie
Chimie
Physiologie A
Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire
Clinique de chirurgie cardiaque
Clinique gynécologique
Biologie médicale et pharmacodynamie
Clinique des maladies infectieuses
Hydrologie
Pharmacodynamie
Biochimie appliquée
Hydrologie thérapeutique, climatologie et
écologie sociale
Chimie biologique et médicale
Clinique chirurgicale B
Clinique médicale infantile B

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

MM. BERGER	Physique nucléaire appliquée à la médecine
MANSUY	Neuro-chirurgie
COLLET	Chimie générale et pharmaceutique
LACROIX	Hygiène et climatologie
LIARAS	Clinique chirurgicale propédeutique
LECUIRE	Neuro-chirurgie
REVOL	Médecine générale
GOINARD	Thérapeutique chirurgicale
PONT Maurice	Médecine générale
TRAEGER	Pathologie métabolique et rénale

PROFESSEURS SANS CHAIRE

ROMAN	Parasitologie
FEROLDI	Anatomie pathologique
MORET	Physique biologique
ODDOUX	Botanique et cryptogamie
De SOLLIERS	Chimie analytique
DESPIERRES	Médecine générale
GARIN	Parasitologie
TOLOT	Médecine du Travail
THIVOLET	Hygiène

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES TITULAIRES

CREYSSEL Roger	Chimie biologique
PINET	Electro-radiologie
GUYOTAT	Neuro-psychiatrie
DESCOTES	Chirurgie générale
JOUVET	Pathologie expérimentale
PEYRIN	Physique biologique
TOMMASI	Anatomie pathologique
BUFFARD	Electro-radiologie
LEJEUNE	Médecine générale et thérapeutique
De MOURGUES F.	Stomatologie
NAUSSAC	Maladies infectieuses
REBOUILLAT	Chirurgie générale
ROMAGNY	Pédiatrie
DELAHAYE	Médecine générale
DELEUZE	Anesthésiologie
GIRAUD	Electro-radiologie diagnostic et thérapeutique
MICHEL	Anesthésiologie
FRANÇOIS	Pédiatrie et Puériculture

MM. MICHOUPLIER

COLOMB

LAMBERT

FRIES

GILLY

ROBERT

BOUCHET

BETHENOD

GERMAIN

KALB

LARBRE

SOUSTELLE

VIALA

VINCENT

GIROD

GRAS

MALLEIN

COLIN

BERTRAND

MARET

VIALLIER-RAYNARD

CHOLLAT

FLEURETTE

Chirurgie générale

Dermatologie

Médecine générale

Médecine générale

Pédiatrie

Médecine générale

Anatomie

Pédiatrie

Immunologie, sérologie, hématologie

Pneumo-phtisiologie

Pédiatrie

Chirurgie générale

Médecine générale

Bactériologie, parasitologie, virologie

Histologie et embryologie

Chimie biologique

Chimie analytique

Médecine légale

Chimie biologique

Chirurgie générale

Bactériologie

Electro-radiologie

Bactériologie

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES STAGIAIRES

FAVRE-GILLY

RIFFAT

FLANDROIS

ROLLET

Hématologie

Hygiène

Physiologie

Pharmacie galénique

AGREGES EN EXERCICE

MARION Pierre

BONAMOUR

De MOURGUES Georges

DEVIC

DUMONT Martial

DURAND

FRANCILLON

SAUBIER

SCHOTT

ALLEGRE

CHASSARD

FAYSSE

GAILLARD

GARDE

Chirurgie générale

Ophtalmologie

Chirurgie générale

Médecine générale

Obstétrique

Urologie

Chirurgie générale

Chirurgie générale

Neuro-psychiatrie

Neuro-chirurgie

Electro-radiologie

Orthopédie

Oto-rhino-laryngologie

Médecine générale

MM. HUGONNIER
MORNEX
MOUNIER-KUHN Alain
NORMAND
PERRIN André
DUMAS
GARMIER
NOEL
SCHNEPP
NOTTER

Ophtalmologie
Médecine générale
Chirurgie générale
Médecine générale
Médecine générale
Stomatologie
Obstétrique
Médecine générale
Orthopédie
Gynécologie obstétricale

Examineurs de la thèse :

- Président : M. le Professeur M. CHAMBON
- Assesseurs: MM. L. ROCHE
L. PERROT
J. GRAS

A la mémoire de mes grands parents paternels ,

qui, par leur carrière médicale, m'ont
orienté de très bonne heure vers les
sciences pharmaceutiques.

A la mémoire de ma grand mère maternelle ,

qui a su, lors de mon enfance, m'élever
dans sa douce affection ...
Tendre souvenir , vive reconnaissance .

A la mémoire inoubliable de ma mère ,

Sa vie demeurera, pour moi, le plus
bel exemple d'amour et de sacrifice.

A mon grand père maternel ,

En profonde et affectueuse reconnais-
sance pour son inestimable dévouement.

A mon père ,

Bien faible témoignage de mon amour
filial et de ma reconnaissance pour les
sacrifices qu'il s'est imposé durant mes
études.

A mes beaux parents ,

En affectueux hommage pour la tendresse
et la confiance dont ils ont toujours su
m'entourer .

A ma femme ,

En témoignage de mon amour ,
je lui dédie ce travail auquel
elle a grandement participé .

A mes filles :

VO PHI NGOC TRAM (Primevère)

VO PHI LAM NGOC (Jade bleu)

avec tout mon amour paternel.

A tous ceux qui me sont chers

A Monsieur et Madame LA THANH TRUNG

En respectueux hommages.

A Monsieur et Madame LE VAN VUI

En gage de notre affection.

A Monsieur et Madame B. VADOT

pour l'aide précieuse et amicale qu' ils
nous ont apportée dans la réalisation de
ce travail.

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur M. CHAMBON

Professeur de Chimie organique et de Toxicologie

Directeur de l'Institut de Pharmacie Industrielle de
LYON

Officier de la Légion d'Honneur

qui a été l'instigateur de ce travail et nous a prodigué , en toutes occasions , conseils et encouragements dans la poursuite de nos recherches.

Nous avons pu profiter de sa haute compétence dans le domaine des sciences chimiques et toxicologiques . Nous avons été constamment stimulé par son enthousiasme scientifique, son inlassable activité et nous sommes fiers de pouvoir compter parmi ses élèves.

Nous le prions de bien vouloir accepter l'expression de notre profonde gratitude, de notre respectueuse admiration et de notre entier dévouement.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur L. ROCHE

Professeur de Médecine Légale et de Déontologie

Médecin des Hôpitaux

Il nous fait l'honneur de bien vouloir
faire partie de notre jury.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expres-
sion de nos respectueux remerciements et
de toute notre reconnaissance.

Monsieur le Professeur L. PERROT

Professeur de Chimie

Pharmacien - Chef des Hôpitaux

qui nous a toujours témoigné de sa bienveillance

Qu'il nous soit permis de lui adresser
l'expression de notre profonde gratitude.

Monsieur le Professeur Agrégé J. GRAS

qui a bien voulu juger ce travail.

Nous ne saurions trop lui exprimer nos
très vifs et respectueux remerciements.

A NOS MAITRES de la Faculté de Pharmacie de PARIS

A NOS MAITRES de la Faculté mixte de Médecine et
de Pharmacie de LYON.

INTRODUCTION

La lutte contre la malaria, menée par l'Organisation Mondiale de la Santé dans l'Asie du Sud-Est et dans l'Afrique noire, a particulièrement attiré notre attention.

Parmi les antipaludéens de synthèse utilisés, la Chloroquine de la famille des amino-4 quinoléines, qui de l'avis des malariologues est le schizonticide le plus actif actuellement connu, occupe une place de choix. Cependant, quelques souches résistantes ont été signalées dans des régions endémiques.

Ce médicament relativement récent prend une extension considérable dans plusieurs domaines thérapeutiques depuis ces dernières années. Au départ indiquée contre la malaria, la Chloroquine se révéla, par la suite, efficace dans les traitements antirhumatismaux, en particulier le rhumatisme articulaire chronique, et dans les traitements des diverses affections cutanées d'étiologie encore indéterminée comme le lupus érythémateux. De plus, elle possède une action intéressante contre les leishmanioses, l'amibiase hépatique, l'asthme et la lèpre. Tout récemment, elle semble douée d'un certain pouvoir d'inhibition des fibroblastes dans les tumeurs malignes (56).

Parallèlement à ses remarquables propriétés thérapeutiques, la Chloroquine, à plusieurs occasions, se comporte comme un véritable

toxique. Des intoxications mortelles par cette drogue dans un but de suicide ou même d'avortement sont fréquemment signalées dans la littérature. Chez les enfants, les cas d'intoxication accidentelle ne sont pas moins importants. La négligence des parents, qui sont souvent des anciens rapatriés des pays tropicaux, ou des malades en cours d'un traitement antirhumatismal, et qui disposent ainsi de grands stocks de comprimés de Chloroquine, conduit facilement au drame.

C'est sous le double aspect de toxicologie et de pharmacologie, et dans le sillage des travaux du laboratoire de notre Maître, Monsieur le Professeur M. CHAMBON, que nous avons orienté notre étude sur la Chloroquine.

Après l'exposé des travaux antérieurs sur ce médicament, nous étudierons son métabolisme dans l'organisme animal. Nous discuterons dans une expérimentation particulière, les différentes méthodes de dosage Et nous porterons surtout notre attention sur les métabolites de la Chloroquine, principalement son dérivé conjugué. L'intérêt de ce dernier réside dans le fait qu'il représente un mode de détoxication général de l'organisme.

La liaison de la Chloroquine avec les protéines plasmatiques sera abordée avec une nouvelle méthode de dialyse dynamique en comparaison avec la classique dialyse statique. Et le dédoublement de ses antipodes optiques sera étudié avec la méthode de RIEGEL et SHERWOOD (102) légèrement modifiée dans un but d'efficacité et de rapidité.

Notre travail fut particulièrement favorisé par la gravidité d'une chienne en cours d'expérience, ce qui nous permettra d'aborder un chapitre d'actualité depuis l'histoire du Thalidomide : l'étude du passage des toxiques et de leurs métabolites de la mère au fœtus .

Nous limiterons notre travail à une étude précise sur le transfert placentaire de la Chloroquine et de ses dérivés.

Enfin, nous confronterons nos résultats avec ceux des travaux antérieurs et en dégagerons les conclusions qui s'imposent.

Notre plan de travail est le suivant :

P R E M I E R E P A R T I E

TRAVAUX ANTERIEURS

CHAPITRE PREMIER :

- I°) HISTORIQUE DE LA CHLOROQUINE
- II°) SA SYNTHÈSE
- III°) SES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

CHAPITRE DEUXIÈME

- I°) INDICATIONS THÉRAPEUTIQUES DE LA CHLOROQUINE
- II°) SA TOXICITÉ
 - A. Toxicité aiguë chez les adultes, les enfants
et la femme enceinte
 - B. Toxicité chronique et Effets secondaires
chez l'homme
 - C. Propriétés pharmacodynamiques secondaires
- III°) SON MÉTABOLISME DANS L'ORGANISME

CHAPITRE TROISIÈME

- I°) SÉPARATION ET IDENTIFICATION DE LA CHLOROQUINE
- II°) SES MÉTHODES DE DOSAGE

D E U X I E M E P A R T I E

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE PREMIER :

METABOLISME ET ELIMINATION DE LA CHLOROQUINE

I°) Etude des Méthodes de Dosage

II°) Expérimentation chez le chien

A. Dosage de la Chloroquine dans les urines
et dans les organes

B. Identification de la Chloroquine dans les
urines et dans les organes

C. Identification du dérivé de conjugaison de
la Chloroquine dans les urines
et dans les organes

CHAPITRE DEUXIEME :

ETUDE DE LA LIAISON DE LA CHLOROQUINE AUX PROTEINES PLASMATIQUES

A. Dialyse dynamique

B. Dialyse statique

CHAPITRE TROISIEME :

ETUDE DU DEDOUBLEMENT DES ANTIPODES OPTIQUES DE LA CHLOROQUINE

CHAPITRE QUATRIEME :

ETUDE DU PASSAGE A TRAVERS LE PLACENTA DE LA CHLOROQUINE ET DE SES DERIVES

T R O I S I E M E P A R T I E

I°) DISCUSSION

II°) CONCLUSIONS

. . .

BIBLIOGRAPHIE

P R E M I E R E P A R T I E

TRAVAUX ANTERIEURS

CHAPITRE PREMIER

I - HISTORIQUE DE LA CHLOROQUINE

ERHLICH, en 1891, étudiant le bleu de méthylène, reconnut que ce colorant présentait une action antimalarique intéressante, quoique inférieure à celle de l'alcaloïde retiré des écorces de quinquina : la quinine. Mais la première guerre mondiale montra la nécessité de rendre le traitement de la malaria indépendant des plantations de quinquina, ce qui fut à l'origine de nombreuses recherches entreprises par des chimistes allemands.

Reprenant les travaux d'ERHLICH, ces derniers trouvèrent que, dans la molécule du bleu de méthylène, le remplacement d'un groupe méthyle fixé sur l'azote par une chaîne dialkylaminoalkyle lui attribue des propriétés antimalariques plus accusées, mais des indices thérapeutiques défavorables. Abandonnant alors le noyau thiazine, ils portèrent leurs efforts sur les groupes actifs de la quinine.

Après de nombreux essais sur plus de 6.000 composés, SCHULEMAN et ses collaborateurs aboutirent, en 1929, à la synthèse de la Pamaquine ou (diéthylamino-4 méthyl-1 butylamino) - 8 quinoléine. Ce produit exerça un effet favorable sur la malaria. Mais son emploi fut limité par suite de sa toxicité (15 à 20 fois plus toxique que la quinine).

A la suite des recherches sur les amino-8 quinoléines, il semblait logique d'étudier les relations existant entre l'action antimalarique et la position de la chaîne latérale fixée sur le noyau quinoléine. Parmi les 14.000 composés synthétisés et étudiés par les laboratoires de recherche anglais et américains, pendant la guerre de 1941 à 1945, deux d'entre eux se sont montrés d'un intérêt incontestable : la Chloroquine et la Paludrine. (7)

La synthèse de la Chloroquine est due à ANDERSAG, BREITNER et JUNG (2). Elle est reprise par SURREY et HAMMER en 1945 (120), en vue de sa préparation à l'échelle industrielle.

II - SYNTHÈSE DE LA CHLOROQUINE

Nous allons voir maintenant la synthèse de la Chloroquine qui est la chloro-7 (diéthylamino-4 méthyl-1 butylamino)-4 quinoléine.

Dans le procédé original, ANDERSAG, BREITNER et JUNG (2) ne donnèrent que très peu de détails sur les étapes intermédiaires nécessaires de leur synthèse. En 1945, SURREY et HAMMER (120) reprirent cette synthèse et apportèrent des précisions sur leur technique. Cette dernière est à la base de la préparation industrielle pharmaceutique de la Chloroquine.

A - SYNTHÈSE DE SURREY ET HAMMER

La synthèse de la Chloroquine comprend trois phases essentielles:

1) Préparation du chloro-7 hydroxy-4 quinoléine carbonate d'éthyle

Il faut condenser la méta-chloraniline avec l'oxalacétate d'éthyle en milieu acétique à une température de 40° à 50° C. La cyclisation se fait ensuite par chauffage dans un bain d'huile minérale à 250° C. Mais on obtient deux isomères chlorés en 5 et en 7.

Leur séparation s'effectue de la manière suivante : les isomères sont dissous dans l'acide acétique chaud. La solution est ensuite refroidie et filtrée. Le dérivé chloré en 7 est le moins soluble. Aussi sera-t-il retenu et recristallisé dans la pyridine.

2) Préparation de la dichloro-4 , 7 quinoléine

Le chloro-7 hydroxy-4 quinoléine carbonate d'éthyle donne, par saponification, l'acide chloro-7 hydroxy-4 quinoléine carbonique. Sa décarboxylation se fait dans l'huile minérale chauffée à 270° C. La chloro-7 hydroxy-4 quinoléine se sépare à froid.

Ce corps est chauffé, à l'ébullition, en présence d'oxychlorure de phosphore. Le mélange est alcalinisé par l'ammoniaque et la dichloro-4,7 quinoléine est extraite par le chlorure de méthylène.

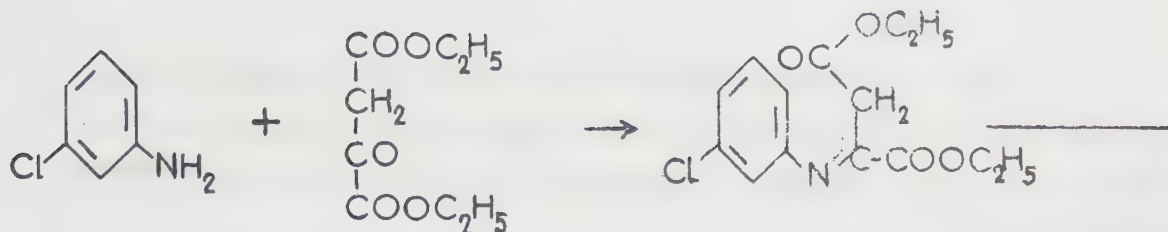
3) Obtention de la Chloroquine

Ce dernier noyau est condensé avec la diéthylamino-4 méthyl-1 butylamine par chauffage à 160° C.

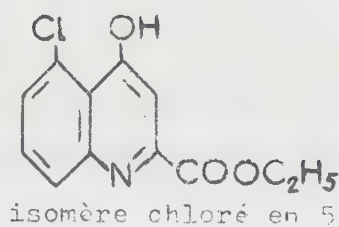
Le produit de la réaction est lavé à la soude et extrait à plusieurs reprises par l'éther. Après l'évaporation des solvants, la base quinoléique est purifiée par distillation sous pression réduite, et recristallisée dans différents solvants.

Enfin, la Chloroquine est transformée en diphosphate suivant la technique utilisée par les Laboratoires WINTHROP aux Etats-Unis (65), ou en sulfate monohydraté par la Société SPECIA en France (115).

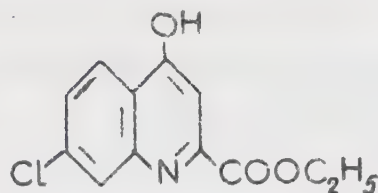
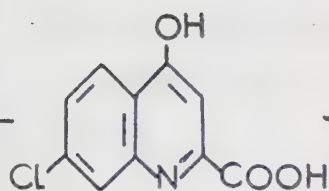
SYNTHÈSE de la CHLOROQUINE d'après Surrey et Hammer



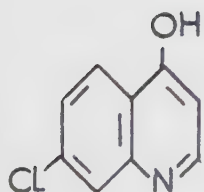
m-chloroaniline Oxalacétate d'éthyle



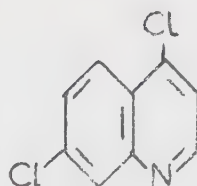
isomère chloré en 5



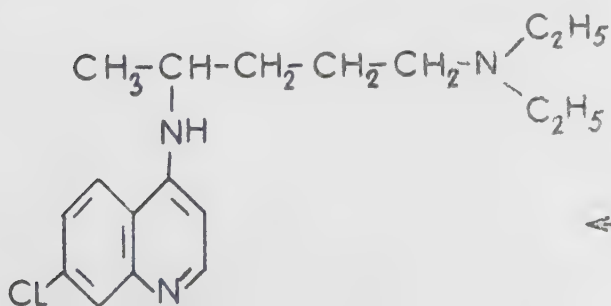
isomère chloré en 7



Chloro-7 hydroxy-4 quinoléine



Dichloro-4,7 quinoléine



B - SYNTHÈSE DE JOHNSON ET BUELL

Dans la synthèse de SURREY et HAMMER, il se produit environ 50 pour cent d'isomère chloré en 5 indésirable. Pour augmenter le rendement, une nouvelle méthode de préparation a été proposée par JOHNSON et BUELL (63) :

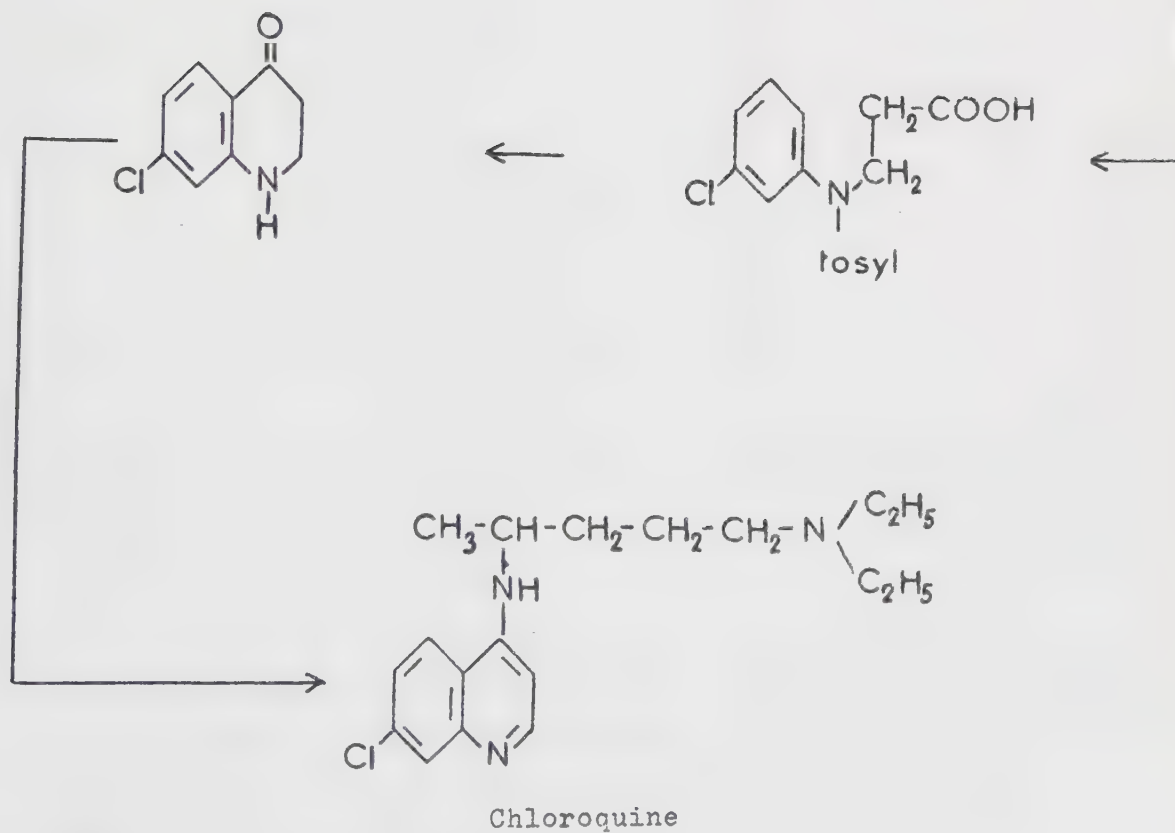
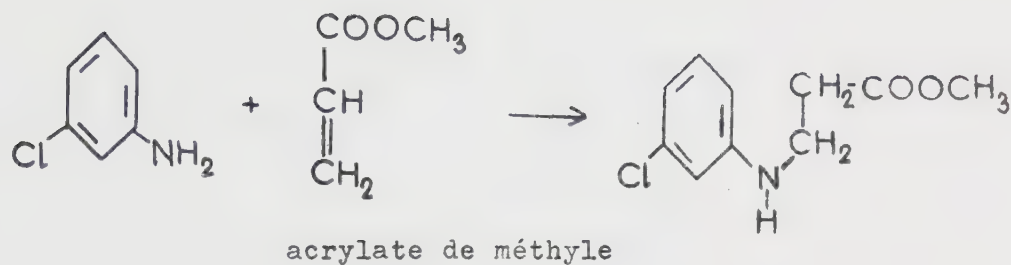
Le produit d'addition de la méta-chloraniline avec l'acrylate de méthyle est tosylé et hydrolysé pour donner un acide correspondant. Ce dernier, par cyclisation puis par détosylation, donne uniquement un dérivé chloré en 7 : la céto-4 chloro-7 tétrahydro-1, 2, 3, 4 quinoléine.

La condensation de ce dérivé avec la diéthylamino-4 méthyl-1 butylamine, en présence d'un agent oxydant comme le nitrobenzène aboutit à la Chloroquine.

SYNTHESE de la CHLOROQUINE

19

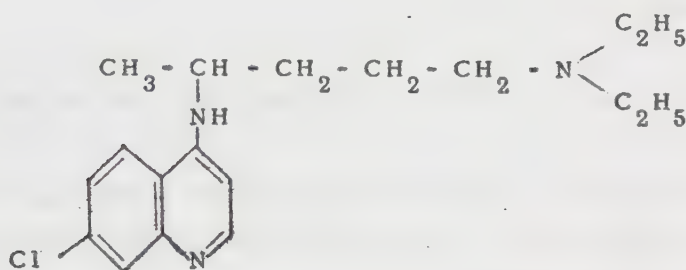
d'après Johnson et Buell



III - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

DE LA CHLOROQUINE

La Chloroquine est la chloro-7 (diéthylamino-4 méthyl-1 butylamino)-4 quinoléine.



Formule structurale de la Chloroquine

A l'état de base, la Chloroquine fond à 87° (82).

Une solution chlorhydrique 0,1 N de Chloroquine base présente trois maxima d'absorption dans l'ultra-violet, dont le plus grand se trouve à 342 mμ, les deux autres étant à 257 mμ et à 330 mμ (100).

Les solutions acides de Chloroquine, dans l'ultra-violet, donnent une fluorescence verte différente de la fluorescence bleue des sels de Quinine. La fluorescence augmente avec le pH. Entre pH 3 et 6, elle est sensiblement constante. A partir de pH 6,9, un ton violet se mêle au vert. Le virage s'accroît jusqu'à 7,7 où la fluorescence est complètement violette. (94).

Dans sa structure, LACAPERE et ses collaborateurs (69), après l'étude de différents tests chimiques, ont montré :

1) que l'atome de chlore est solidement fixé sur le cycle quinoléique et que son remplacement par des groupements OH et NH_2 , par des procédés classiques, est très difficile, même à des températures avoisinant 200°C .

2) que la liaison du groupement aminé en 4 sur l'hétérocycle est, elle aussi, très étroite.

3) que la chaîne méthyl butyl est très stable.

De ces remarques, ils ont conclu que la Chloroquine se présente comme une base forte dont la formule forme un groupe homogène remarquable par sa stabilité chimique.

La thérapeutique utilise en France le sulfate de Chloroquine (*), et aux Etats-Unis son diphosphate (**).

SULFATE MONOHYDRATE DE CHLOROQUINE

Formule brute : $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{Cl}, \text{H}_2\text{SO}_4, \text{H}_2\text{O}$

Poids moléculaire: 435,95

(*) : Nom déposé : NIVAQUINE

(**) : Nom déposé : ARALEN

Le sulfate de Chloroquine se présente sous la forme d'une poudre blanche à reflets jaunes, inodore et amère. Il est très soluble dans l'eau (30 pour cent à la température ordinaire), peu soluble dans l'éthanol (2 pour cent à l'ébullition), insoluble dans l'acétone, le chloroforme, le benzène, l'éther et le dioxane (115).

Sa solution aqueuse à 10 pour cent a un pH compris entre 4,0 et 5,0.

Son point de fusion est égal à $207^{\circ},5 \pm 2^{\circ},5$.

Le sulfate de Chloroquine figure à la VIII^e édition de la PHARMACOPÉE FRANÇAISE.

DIPHOSPHATE DE CHLOROQUINE

Formule brute: $C_{18}H_{26}N_3Cl, 2 H_3PO_4$

Poids moléculaire : 515,88

Le diphosphate de Chloroquine est une poudre cristallisée, de saveur amère. Très soluble dans l'eau, il est pratiquement insoluble dans l'alcool, le benzène, le chloroforme et l'éther.

En solution aqueuse à 1 pour cent, il présente un pH de 4,5 environ.

Son point de fusion est de $193^{\circ} - 195^{\circ}$.

CHAPITRE DEUXIEME

I - INDICATIONS THERAPEUTIQUES DE LA CHLOROQUINE

La Chloroquine est utilisée en thérapeutique dans le traitement du Paludisme (23, 32, 57, 60, 61, 86, 104, 108, 116).

SCHNEIDER (106) a considéré le traitement de l'accès palustre comme une urgence médicale, car faute d'une action rapide, la malaria peut évoluer très vite vers une issue fatale. Cependant, pour éviter les rechutes, il faut compléter par un traitement approprié destiné à obtenir la guérison définitive.

La Chloroquine, employée dans des conditions thérapeutiques optima, contribue efficacement à la lutte contre cette maladie. Cependant, des souches résistantes à ce médicament ont été signalées dans différentes régions endémiques : Brésil (13), Cambodge (41), Thaïlande (98 - 132) et Sud Vietnam (99).

A - Dans le traitement curatif de l'accès

1) Chez l'adulte

- par voie orale:

0,600 g voire un gramme, en deux prises dans la même journée (ce traitement est suffisant pour arrêter la schizogonie et donc, l'accès palustre, mais pas toujours pour détruire tous les parasites dans le sang circulant, d'où le risque de voir reprendre la schizogonie et les

accès après quelques semaines d'apyrexie).(IO6)

- par voie parentérale : intramusculaire (en cas d'intolérance digestive)

0,300 g par injection intramusculaire.

Cette dose peut être répétée deux fois dans les vingt quatre heures, à douze heures d'intervalle .

2) Chez l'enfant

- par voie orale

0,05 g par jour jusqu'à un an

0,10 g par jour de 1 à 3 ans

0,15 g par jour de 3 à 6 ans

0,20 g par jour de 6 à 9 ans

0,25 g par jour de 9 à 12 ans

0,30 g par jour au-dessus de 12 ans.

- par voie parentérale: intramusculaire ou sous-cutanée, jamais par voie intraveineuse.

5 milligrammes par kilogramme de poids

3) Chez la femme enceinte

Le traitement du paludisme ne pose aucun problème particulier.

Remarques:

Il est à noter que, dans la cure radicale du paludisme (prévention des rechutes) qui consiste à détruire les formes tissulaires persistantes, responsables de reviviscences tardives de la maladie, la Chloroquine, comme les autres schizonticides des amino-4 quinoléines, n'a aucune action sur ces formes. On doit faire appel aux groupes des amino-8 comme la pamaquine, la rhodoquine, la primaquine qui sont des gamétocides.

B - Dans le traitement préventif du paludisme

La Chloroquine permet d'arrêter la schizogonie intraglobulaire et met ainsi l'individu impaludé à l'abri des manifestations cliniques de la maladie.

1) Dose hebdomadaire : 0,600 g en une fois, ou par
deux fractions de
0,300 g, par voie orale

2) Dose quotidienne: 0,100 g par voie orale

. . .

La Chloroquine est aussi largement utilisée dans les maladies du collagène, l'amibiase hépatique, la leishmaniose, la vaginite à trichomonas (6, 40, 49, 52, 79, 83, 95, 115)

1) Dans le lupus érythémateux :

0,300 à 0,400 g par jour, par voie orale, pendant 8 à 15 jours, puis 0,200 g par jour pendant deux à trois semaines.

2) Dans la polyarthrite chronique évolutive :

0,200 g par jour, par voie orale, pendant un à six mois.

3) Dans l'amibiase hépatique et la leishmaniose :

0,300 g deux fois par jour, par voie orale, pendant deux jours ou plus long, puis une fois par jour pour deux ou trois semaines suivantes.

4) Dans la vaginite à trichomonas :

O,150 g par jour, sous forme de suppositoire, pendant cinq
à six semaines.

II - TOXICITE DE LA CHLOROQUINE

La Chloroquine est un agent médicamenteux de plus en plus employé. Le champ de ses applications thérapeutiques ne cesse de s'accroître. Parallèlement, le risque d'intoxication par cette drogue augmente.

Des cas d'intoxication par la Chloroquine dans un but de suicide ou d'avortement sont souvent signalés. Cette fréquence réside dans le fait qu'à l'heure actuelle, n'importe qui peut obtenir ou détenir de véritables stocks d'antimalariques de synthèse, en l'absence de contrôle médical, et ceci surtout dans les collectivités tropicales.

A - TOXICITE AIGUE chez les adultes, les enfants et la femme enceinte

De nombreux auteurs rapportent des cas d'intoxication aiguë par la Chloroquine (12, 24, 61, 67, 70, 75, 91, 93). Mais la dose mortelle ingérée per os varie selon les cas.

Dans une observation de LARRIBAUD (70), 6 grammes de Chloroquine base ont entraîné la mort d'un jeune homme de 20 ans, alors que BELLEVAUX (9) note l'issue fatale d'une femme de 22 ans qui aurait absorbé 2,6 g de sulfate de Chloroquine.

CANN et VERHULST (24) ont décrit quatre cas d'intoxication accidentelle chez les enfants dont un seul survécut. Nous reproduisons ici deux de ces cas typiques pour montrer la grande toxicité de la Chloroquine vis-à-vis des enfants.

Cas N°1 : Un garçon de trois ans, ayant absorbé 0,75 ou 1 gramme de diphosphate de Chloroquine, sous forme de comprimés, a été transporté peu après à l'hôpital. Le lavage de l'estomac était pratiqué environ une heure après l'ingestion. Pendant l'opération, l'enfant commençait à présenter des convulsions et des crises de dyspnée, puis survint l'arrêt cardiaque. Le massage cardiaque et tous les efforts de réanimation échouèrent. L'enfant mourût deux heures et demie après l'absorption de la Chloroquine.

Cas N°2 : Un garçon de 14 mois a ingéré entre 1 gramme et 2 grammes de diphosphate de Chloroquine. 45 minutes après, s'est fait le lavage gastrique et 1 heure 45 après l'ingestion, l'arrêt cardiaque et respiratoire se produisit. La trachée fut intubée, et le massage cardiaque fut pratiqué. Le coeur répondit faiblement pour un temps court, mais l'enfant mourut approximativement 2 heures après l'absorption du toxique.

HARRIS (53) a rapporté deux cas d'intoxication due à un surdosage qui a provoqué la mort de deux enfants respectivement de 5 mois et de 17 mois. Le premier a reçu une injection de 120 mg de Chloroquine base, et le second une injection de 100 mg. Ces doses dépassent largement celles recommandées par les fabricants, c'est-à-dire 5 milligrammes par kilogramme de poids corporel.

La Pharmacopée Française n'envisage que la voie buccale chez les jeunes enfants : 50 à 100 mg, à répartir dans les 24 heures.

Chez la femme enceinte, un cas d'intoxication accidentelle par l'ingestion d'une forte dose de Chloroquine a été observé par KJAER (67). Mais la guérison était complète en moins de 36 heures et il n'y avait pas d'effets défavorables sur la suite de la grossesse.

Le tableau clinique de l'intoxication est assez univoque. Les signes cliniques sont d'ordre nerveux, digestif, cardiorespiratoire et urinaire (70).

1) Troubles d'ordre nerveux :

- Coma profond, calme et hyperthermique avec refroidissement périphérique.
- Crises convulsives du type épileptique.
- Troubles visuels associés à un myosis.

2) Troubles digestifs :

- Vomissements

3) Troubles cardio-respiratoires :

- Dyspnée marquée.
- Paralysie de déglutition.
- Chute de tension.

4) Troubles de la sécrétion rénale :

- Oligurie.

Les études anatomo-pathologiques d'après l'observation de nombreux cas par LARRIBAUD et ses collaborateurs (70) révèlent

1) de l'oedème cérébral, le système nerveux semblant le moins atteint ;

2) des lésions pulmonaires: congestion et oedème , alvéolite oedémateuse ;

3) des lésions du tractus digestif et de ses annexes : dilatation vasculaire et purpura au niveau de la muqueuse stomacale, état congestif du foie, nécrose des tubes sécréteurs et excréteurs des reins.

De ces différentes atteintes de l'organisme, ces auteurs déduisent

une hypothèse sur le mécanisme de l'intoxication aiguë due à la Chloroquine. L'introduction d'une quantité massive de Chloroquine dans le tractus digestif amène probablement une concentration sanguine dans le courant porte, telle que les capacités d'absorption du parenchyme hépatique sont dépassées. Les taux sanguins extrêmement élevés ainsi atteints exercent une toxémie néfaste sur les autres parenchymes, en particulier celui des reins. Ces derniers ne peuvent plus remplir leur rôle d'épurateur. Les centres nerveux bulbaires et supérieurs sont sidérés à leur tour. Cette atteinte aux centres nerveux suffisamment brutale entraîne une perte de connaissance extrêmement rapide, et des perturbations végétatives responsables de la mort.

Antidote et Traitement d'urgence :

Devant la gravité et l'évolution rapide des cas d'intoxication aiguë par la Chloroquine, il n'existe, jusqu'à présent, aucun antidote efficace (34 - 74).

Face à ces éventualités, LARRIBAUD (70) propose une attitude thérapeutique: traitement purement symptomatique. Les moyens modernes de réanimation médicale doivent être mis en oeuvre dans un délai le plus bref. Pour lutter contre les troubles cardio-vasculaires, on doit recourir aux tonicardiaques et aux vasopresseurs puissants. La défaillance respiratoire sera traitée par désobstruction trachéobronchique après trachéotomie, et par assistance respiratoire par les appareils à ventilation endotrachéale, type Engstroën. L'arrêt cardiaque éventuel sera combattu par le massage du coeur.

On peut augmenter la vitesse d'excrétion rénale par des acidifiants urinaires ou par des méthodes modernes telles que l'épuration extra-rénale.

Ainsi , il est nécessaire de transporter ces intoxiqués dans un centre spécialisé, et seule la rapidité permet de lutter avec quelque espoir de réussir.

B - TOXICITE CHRONIQUE DE LA CHLOROQUINE

Des manifestations d'intolérances dues à la Chloroquine, au cours des traitements prolongés, sont fréquemment signalées par de nombreux auteurs, en particulier ALVING et ses collaborateurs (1) ayant étudié spécialement la toxicité chronique de ce médicament chez des sujets volontaires.

Les effets secondaires suivants ont été rapportés :

1) Réactions gastro-intestinales (51) :

- Anorexies
- Nausées
- Vomissements
- Diarrhées
- Douleurs abdominales

2) Réactions nerveuses :

- Céphalées (1, 73)
- Etourdissements (51, 105)
- Insomnies (28)

3) Réactions oculaires :

- Troubles de l'accommodation (105)
- Altérations de la cornée (64, 105, 133)
- Altérations rétiniennes (39, 48, 105, 118)

4) Réactions cutanées de type toxique et allergique :

- Urticaire (51, 54)
- Eczéma (54)
- Prurits (28, 54)
- Dermite exfoliatrice généralisée (25)

5) Réactions pileuses :

- Dépigmentation des cheveux (1)
- Chute des cheveux (25)

6) Réaction systémique :

- Perte pondérale (1)

Toutes ces manifestations d'intolérance sont réversibles et souvent passagères (69). Chez des malades porteurs de lupus érythémateux, le tableau clinique des cas d'intolérance à la Chloroquine ressemble à celui d'une carence en vitamine B₆. Ce médicament est bien toléré s'il est donné en association avec de la pyridoxine (52).

C - PROPRIETES PHARMACODYNAMIQUES SECONDAIRES

DE LA CHLOROQUINE

CANN et VERHULST, dans un intéressant article sur la toxicité de la Chloroquine, ont rapporté les différentes propriétés pharmacodynamiques secondaires de ce médicament. La Chloroquine possède des effets cardio-vasculaires similaires à ceux de la Quinine et de la Quinidine. Elle déprime l'excitabilité et la conductivité du muscle cardiaque du chat (24). ARORA, par contre, a noté la similitude de la Quinidine et de la Chloroquine dans la dépression du myocarde (5).

La Chloroquine produit, d'autre part, un changement électrocardiographique chez des sujets ayant reçu 0,300 g de base par jour ,

pendant onze semaines. Ce changement consiste en une diminution concordante de la hauteur de l'onde T (1). Le puissant effet cardiaque de ce produit serait dû à sa configuration de chloro-7 amino-4 quino-léine (24).

D'importantes élévations du taux de la glycémie chez les lapins, après une injection de la Chloroquine, ont été observées par LACAPERE (69).

Une action de libération d'histamine par la Chloroquine a été signalée chez les rats (72). Ce médicament peut provoquer aussi une action anesthésique locale (62).

Enfin, l'expérience effectuée sur les tétards a permis à HOPKINSON de conclure que la Chloroquine provoque le retard de la croissance (58).

III - METABOLISME DE LA CHLOROQUINE

L'intérêt de l'étude du métabolisme des médicaments a été souligné, avec vigueur, par Monsieur le Professeur M. CHAMBON, dans une conférence prononcée au Congrès des Pharmaciens de la Alta Italia (26). Il nous paraît utile de reproduire, ici, les principales raisons évoquées pour pouvoir mieux situer l'importance de cette étude.

En effet, les médicaments, extractifs ou synthétiques, véritables corps étrangers, sont administrés à l'organisme pour corriger les désordres provoqués par la maladie ou en supprimer la cause lorsqu'il s'agit d'agents infectieux. Dès lors, l'expérimentation pharmacologique indispensable à la définition de la toxicité aiguë et chronique doit pousser très loin ses investigations, non seulement pour permettre l'extrapolation de l'animal de laboratoire à l'homme, mais encore pour s'assurer que le fœtus ou même l'embryon n'en pâtiront point si l'on ne veut revoir la tragédie du Thalidomide.

De nouvelles raisons incitent à s'intéresser au devenir des médicaments dans l'organisme. On peut penser que, au cours de ses biotransformations, un métabolite puisse interférer avec quelque fonction normale et ainsi jouer son rôle pharmacologique. D'autre part, la connaissance exacte des divers métabolites formés peut permettre de remonter aux systèmes enzymatiques responsables et par là, découvrir l'un d'entre eux qui serait ainsi révélé. Enfin, une meilleure connaissance de la voie de transformation d'un type de médicament peut conduire le chimiste à orienter ses synthèses vers une molécule soit plus stable, soit plus fragile en vue d'atteindre un résultat thérapeutique

déterminé ; tels par exemple les barbituriques à durée d'action longue ou brève.

Au point de vue toxicologique, la connaissance des métabolites caractéristiques de la substance étudiée présente un grand intérêt. En effet, si certains sont dépourvus de nocivité ou présentent une nocivité très inférieure à celle des produits qui leur ont donné naissance, d'autres manifestent au contraire une toxicité plus considérable et d'ailleurs parfois orientée différemment.

Ainsi, nous ne nous étonnons pas de voir publier de nombreux travaux d'une richesse d'expérimentation remarquable sur le métabolisme de la Chloroquine qui est un médicament d'usage très courant, par suite de son large éventail thérapeutique.

A - TRANSFORMATION DANS L'ORGANISME

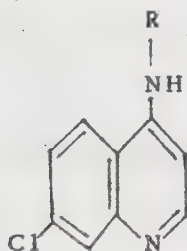
D'après WILLIAMS (127), administré chez l'homme, peu de Chloroquine est excrété sous la forme inchangée, et le produit d'excrétion présente un pouvoir rotatoire positif. De ce fait, il semble qu'un isomère optique de ce produit soit dégradé préférentiellement dans l'organisme.

Par ailleurs, le métabolite principal observé de ce médicament est son dérivé monoéthyl (78) possédant un grand pouvoir rotatoire positif, et une grande activité contre la malaria aviaire. Mais ce dernier est faiblement absorbé chez l'homme.

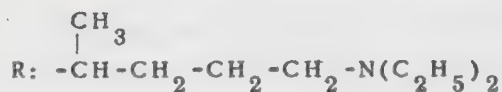
Dans l'urine humaine, TITUS et ses collaborateurs (122) ont identifié, par la technique de distribution à contre courant, une série de métabolites de la Chloroquine. Ils ont montré que le noyau quinoléique

reste apparemment intact dans ces réactions de dégradation. D'autre part, un des deux radicaux éthyl attachés à l'azote terminal de la chaîne latérale est probablement éliminé par l'oxydation.

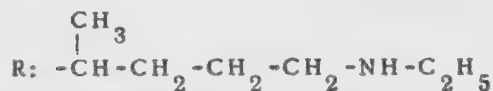
La méthode de chromatographie sur papier a permis à KURODA (68) de séparer quatre métabolites dans les tissus des victimes des intoxications par la Chloroquine. L'examen spectrophotométrique, dans l'infra-rouge, des éluats des spots correspondants révèle des spectres d'absorption très proches de celui du produit de départ, ce qui suggère à l'auteur de penser que les métabolites observés proviennent uniquement des altérations de la chaîne latérale de la molécule de l'alcaloïde. D'autre part, les R_f des dérivés de l'amino-4 quinoléine synthétisés et utilisés comme témoins sur les chromatogrammes ont conduit à l'identification de ces produits de transformation.



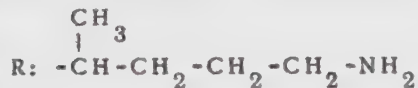
Chloroquine



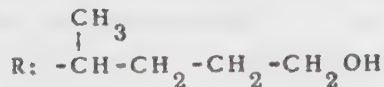
Métabolite I



Métabolite II



Métabolite III



Métabolite IV



Dans l'urine des sujets volontaires, cet auteur a retrouvé ces quatre produits jusqu'à 12 jours après l'ingestion de la Chloroquine.

B - GLYCUROCONJUGAISON

Le mécanisme de la glycuconjugaison de la Chloroquine, selon TITUS (123), semble se produire par l'oxydation de l'azote terminal de la chaîne latérale, pour aboutir à un acide, en passant par la formation d'un amine-oxyde.

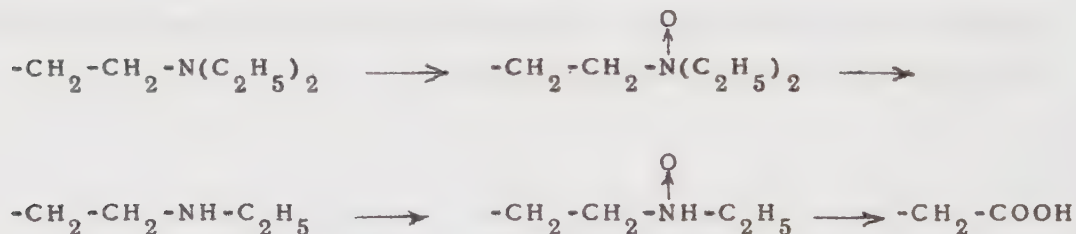


Schéma de réaction donné par WILLIAMS (77)

Cependant, SMITH et WILLIAMS (112), travaillant sur l'amino-4 quinoléine, ont trouvé que ce produit est hydroxylé en amino-4 hydroxy-3 quinoléine et est excrété principalement sous la forme de sulfate d'ester chez le lapin.

D'après ces auteurs, la glycuconjugaison de l'amino-4 quino-
léine est faible et il semble qu'il y ait peu de formation de N-glycu-
nides. Ils pensent que les amino-4 chloro-7 quinoléines se comportent
comme les amino-4 quinoléines et soient hydroxylées en un dérivé
hydroxy-3 correspondant.

C - ABSORPTION ET EXCRETION

BERLINER (10) a administré à deux malades 0,40 g de diphosphate de Chloroquine par jour, jusqu'à l'obtention d'un taux sanguin constant de 217 μ g par litre. Au cours des dernières 48 heures de médication, il a trouvé une excrétion fécale et urinaire journalière correspondant respectivement à 8 pour cent et à 14 pour cent de la dose administrée. Cette faible quantité de médicament retrouvée dans les fèces montre que la Chloroquine est presque complètement absorbée par le tractus gastro-intestinal.

D'après le même auteur, l'excrétion rénale de la Chloroquine ne dépend pas seulement de sa concentration réelle dans le plasma et dans les tissus, mais aussi de plusieurs autres facteurs tels que l'équilibre acido-basique de l'organisme. En effet, la vitesse de l'excrétion rénale peut être accélérée par un acide ou diminuée par une base. Chez des sujets ayant reçu une dose égale de Chloroquine, JAILER (59) a observé une moyenne d'excrétion urinaire de 23 pour cent de la dose journalière. L'administration de 20 g de carbonate monosodique par jour fait tomber l'excrétion à 13 pour cent, et l'ingestion de 8 g de chlorure d'ammonium le fait augmenter à 35 pour cent.

Dans une autre expérience, FUHRMANN et KOENIG (47) ont donné une dose unique de 0,12 g de diphosphate de chloroquine à six volontaires et ont déterminé l'excrétion urinaire pendant 10 jours. Ils ont trouvé, pendant les premières 24 heures, une excrétion importante (4 à 8 pour cent) qui tombe aux environs de 1 pour cent les jours après. L'excrétion totale représente de 12 à 22 pour cent de la dose administrée.

D - TAUX PLASMATIQUES

Le taux plasmatique de la Chloroquine, après son administration par voie orale, a été l'objet de nombreuses études.

BERLINER (10) a montré que l'utilisation répétée de ce médicament donne naissance à un équilibre du taux plasmatique qui est lui-même fonction de la dose. Ainsi, avec une dose journalière de 0,20 g, le taux plasmatique à l'équilibre est de 110 µg par litre. Il passe à 176 µg par litre pour la dose de 0,30 g par jour.

Selon ALVING (1), après l'ingestion par voie orale d'une dose de 0,50 g de Chloroquine base, la moyenne de concentration plasmatique atteint 215 µg par litre après six heures, passe à 94 µg par litre après 48 heures, et descend à 29 µg par litre après une semaine.

Il a été démontré qu'un taux plasmatique de 10 à 20 µg de Chloroquine base par litre est thérapeutiquement efficace (76) et que ce médicament est localisé, en plus grande quantité, dans les leucocytes que dans les érythrocytes (10).

E - DISTRIBUTION

L'étude de la distribution de la Chloroquine dans l'organisme a été entreprise par différents auteurs, sur les animaux de laboratoire, mais aussi quelques fois sur l'homme dans les cas d'intoxication mortelle.

Chez les singes ayant reçu une dose quotidienne de 25 mg de base par kilogramme de poids, pendant 30 à 31 jours, WISELOGLE (128)

a trouvé une répartition suivante :

Tissu ou Organe	Milligrammes de Chloroquine par kilogramme de tissu
Plasma	3,62
Cerveau	48
Coeur	265
Foie	776
Poumon	298
Rate	195
Rein	208

Chez les rats ayant reçu une dose journalière de 25 mg par kilogramme de poids, pendant 10 jours, BERLINER (10) a rapporté ces résultats :

Concentration dans le plasma : 157 µg/litre	
Rapport de concentration : Tissue / Plasma	
Erythrocytes	1,9
Sang total	3,7
Cerveau	31
Muscle	41
Coeur	150
Reins	670
Poumons	640
Foie	420

Ces observations ont permis aux auteurs de conclure que le foie, les reins, la rate, le coeur et les poumons sont les sièges importants de la fixation de Chloroquine.

Récemment, PROUTY et KURODA (100) d'une part, et MONNET (84) d'autre part, travaillant sur des viscères humains, sont arrivés aux mêmes résultats.

L'emploi de la Chloroquine marquée au C_{14} par COHEN (30), chez les rats, révèle des dépôts radioactifs dans les glandes salivaires, le thymus, la région sinusale frontale et particulièrement à la base du cerveau dans la région tubérienne, probablement dans l'hypophyse et dans les glandes surrénales.

SHAFFER (111) a rapporté, par ailleurs, que la concentration de la Chloroquine dans l'épiderme est de 5 à 6 fois plus importante que celle trouvée dans le chorium. D'après cet auteur, la fixation du médicament dans l'épiderme serait due à l'affinité de la Chloroquine pour les protéines de cette région, et aussi à l'état relativement déshydraté de l'épiderme par rapport au chorium.

CHAPITRE TROISIEME

SEPARATION, IDENTIFICATION ET DOSAGE DE LA CHLOROQUINE

Devant le souci de contrôle dans les campagnes d'éradication du paludisme et devant la fréquence des intoxications par la Chloroquine, de nombreux travaux sur la séparation, l'identification et le dosage de ce médicament ont été publiés régulièrement.

I - SEPARATION et IDENTIFICATION

A - SEPARATION

La chromatographie est l'une des techniques les plus utilisées par les différents auteurs pour séparer la Chloroquine des produits biologiques.

1) Chromatographie sur colonne

Cette technique mise au point par Le BRETON et GARAT (71) a permis une séparation rapide de la Chloroquine. Le prélèvement des liquides biologiques ou des organes préparés est alcalinisé par NH_4OH , puis agité avec 2 volumes de chloroforme à deux reprises. Les solutions chloroformiques sont passées sur une colonne de 10 cm de hauteur

constituée par un mélange à partie égale de sulfate de sodium et de carbonate de calcium.

Le chloroforme issu de la colonne est agité deux fois dans une ampoule à décantation avec quelques millilitres de HCl N/20 de façon à obtenir un volume final de 10 ml.

La solution aqueuse chlorhydrique est ensuite examinée au spectrophotomètre dans l'ultra-violet.

2) Chromatographie sur papier

KURODA (68), en utilisant du papier Whatman N° 1 et un système de solvants : n-butanol, acide acétique glacial et eau (10: 1: 5), a réussi à séparer la Chloroquine et ses métabolites dans les tissus humains. Dans cette technique, par voie descendante, la Chloroquine présente un R_f de 0,60 environ.

MONNET et VIALA (85) ont trouvé le même R_f avec un mélange de solvants : n-butanol avec 2 pour cent d'acide acétique, par voie ascendante. Cependant, ils ne précisent pas la nature du papier utilisé.

3) Chromatographie en phase gazeuse

Cette méthode a été utilisée avec succès par VANDEN HEUVEL (125) dans la séparation de la Chloroquine et de ses métabolites.

B - REACTIONS ET TESTS D'IDENTIFICATION

1) Réactions avec les réactifs généraux des alcaloïdes

La Chloroquine base se comporte comme un alcaloïde. Elle précipite avec les réactifs généraux des alcaloïdes (84 , 85), en particulier avec :

- le réactif de BOUCHARDAT (iodo-ioduré)
- le réactif de MAYER-TANRET (iodo-mercurique)
- le réactif de DRAGENDORFF (iodo-bismuthique).

Sur les chromatogrammes, la Chloroquine peut être révélée par une solution d'iodo-platinate de potassium qui donne un spot violet sombre (68).

2) Réactions d'identité (115)

- Acide sulfurique concentré

100 mg de chloroquine ajoutée à 1 ml d'acide sulfurique concentré, donne une solution incolore et reste incolore si on la dilue avec 100 ml d'eau distillée.

Les autres antimalariques de synthèse donnent dans les mêmes conditions des solutions plus ou moins colorées en jaune.

- Dichromate de potassium

La solution sulfurique précédente diluée est additionnée de 5 ml de solution de dichromate de potassium à 5 pour cent. On obtient une solution jaune clair.

La solution de 5 mg de chloroquine dans 5 ml d'acide sulfurique concentré est incolore. Si on ajoute quelques gouttes de

solution de dichromate de potassium à 5 pour cent, il se développe une coloration orangée virant au rouge foncé.

- Acide nitrique

La solution de 5 mg de chloroquine dans 2 ml d'acide nitrique a une coloration jaune pâle.

3) Tests microcristallins

CLARKE (29) a proposé une méthode de tests microcristallins pour l'identification des antimalariques de synthèse. Avec l'acide picrique et l'acide styphnique, la Chloroquine forme des rosettes de plaques caractéristiques.

4) Tests dans l'urine

Les différents tests utilisés pour détecter la Chloroquine dans les urines sont décrits par BRUCE-CHWATT (19). Il s'agit des techniques rapides destinées à contrôler l'absorption de ce médicament dans les grandes collectivités en Afrique et en Asie. La plupart des tests sont colorimétriques (avec réactif de Mayer-Tanret, solution de méthyl - orange ...) D'autres sont néphélométriques et moins intéressants.

II - DOSAGE DE LA CHLOROQUINE

Les méthodes de dosage de la chloroquine, utilisées par différents auteurs, sont nombreuses et variées. Cependant, la spectrophotométrie dans l'ultra-violet reste la technique la plus employée dans la littérature.

1) Méthode spectrophotométrique (84, 92, 100, 117)

La plupart des auteurs travaillent à 342 mμ correspondant au plus grand maximum d'absorption de la Chloroquine. L'extraction de l'alcaloïde se fait en milieu alcalin, soit par l'éther (84), soit par le chloroforme (100). La phase organique est ensuite épuisée par une solution d'acide qui sera examinée au spectrophotomètre.

2) Méthode fluorimétrique (16, 80)

La Chloroquine est extraite des produits biologiques, en milieu alcalin, par un solvant organique : heptane ou dichloréthane. Elle est ensuite transformée en sel correspondant par une solution acide, et tamponnée à pH 9,5. La solution est alors soumise à une irradiation ultra-violette en présence de la cystéine. La mesure de la fluorescence de la solution finale donne la concentration de la Chloroquine dans l'échantillon.

3) Méthode colorimétrique (119)

Cette méthode utilisée par STRUFE est basée sur la formation d'une coloration rouge, lorsque la Chloroquine se trouve en présence d'un mélange d'acide aconitique et d'anhydride acétique.

4) Méthode polarographique (12, 91)

La polarographie a été utilisée par BOURRELIER et OLIVIER , dans la détermination de la Chloroquine. Une solution méthanolique d'alcaloïde en présence du chlorure de lithium, donne une vague dont le potentiel de demi-palier est de -1,15 v.

5) Méthode turbidimétrique (44, 45, 46)

Le principe de cette méthode consiste à extraire de l'urine la Chloroquine base par un solvant en milieu alcalin. L'alcaloïde est ensuite déplacé du milieu organique par une solution d'acide sulfurique, à laquelle on ajoute le réactif de Mayer-Tanret. Un complexe insoluble se forme. L'opacité de ce composé est évaluée par un colorimètre.

DEUXIEME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE PREMIER

METABOLISME ET ELIMINATION DE LA CHLOROQUINE

I - ETUDE DES METHODES DE DOSAGE DE LA CHLOROQUINE

La large diffusion de la Chloroquine en thérapeutique dans les divers traitements a mis ce médicament à la portée d'un grand nombre de malades, notamment les militaires ou fonctionnaires ayant séjourné dans les pays tropicaux, qui peuvent en disposer en quantités très importantes. De ce fait, les cas d'intoxication par ce toxique sont fréquemment signalés dans la littérature. Aussi, le dosage de la Chloroquine et de ses métabolites constitue-t-il le plus souvent l'objectif toxicologique. Dans cet esprit, nous avons pensé à la méthode de M. et P. CHAMBON, utilisée avec succès, lors de l'expertise d'un cas d'intoxication par la Morphine où la technique classique STAS-OTTO se révéla insuffisante (27).

Nous avons, dans une expérimentation particulière, mis en parallèle la classique méthode de STAS-OTTO-OGIER avec celle de M. et P. CHAMBON.

▲ - METHODE DE M. et P. CHAMBON

Cette méthode dont le protocole d'opérations est particulièrement précis et valable pour toutes les expertises légales, dans lesquelles l'alcaloïde présente une suffisante stabilité au traitement, est une adaptation à un but toxicologique de celle de WOODS (131).

Son principe consiste essentiellement dans l'hydrolyse chlorhydrique à l'autoclave à 120° C d'un extractif trichloracétique déféqué des humeurs ou tissus, libérant l'alcaloïde conjugué. L'alcaloïde total, extrait par un solvant organique, est destiné au dosage spectrophotométrique, selon la méthode de BRODIE (15) par formation de complexe avec un acide sulfonique qu'est le méthyl-orange.

La méthode de M. et P. CHAMBON va nous permettre d'extraire et de doser la Chloroquine sous sa forme libre ou conjuguée dans les divers tissus et dans les produits d'excrétion de l'animal.

REACTIFS :

- Acide trichloracétique libre et en solution à 20 pour cent
- Chloroforme pur, lavé et distillé extemporanément :
- Dichloro-1,2 éthane lavé, séché et redistillé
- Solution NaOH 2 N
- Solutions de HCl N/1 et N/2
- Solution d'acide borique 0,5 M (3,09 g/100 ml)
- Réactif du méthyl-orange : Dissoudre à chaud 500 mg de méthyl-orange dans 100 ml d'eau et filtrer à chaud. Agiter trois fois la solution avec un volume égal de chloroforme pur et lavé. Avant usage, diluer 0,5 ml de cette solution stock avec un volume égal de la solution d'acide borique 0,5 M.

TECHNIQUE

1) Déprotéination extractive

Prise d'essai : Au cours d'une expertise ne comportant pas d'orientation très précise, il apparaît nécessaire, malgré la très grande sensibilité de la méthode, d'opérer avec des prélèvements relativement importants qui pourront être de l'ordre de 20 ml urine, 2 à 3 ml bile, 10 g tissu rénal ou hépatique.

Les tissus sont broyés avec éventuellement des appareils spéciaux (*) ou plus simplement au mortier avec du sable lavé et incinéré et en présence de l'acide chlorhydrique N/2, 9 vol. sont amenés à l'état de bouillie homogène dont, par centrifugation, on sépare la phase aqueuse. Cette solution aqueuse extractive est additionnée du 1/10 de son poids d'acide trichloracétique que l'on fait dissoudre, homogénéisée et soumise à centrifugation. On sépare ainsi la solution acide alcaloïdique et privée des protéines.

L'urine est de la même façon additionnée du 1/10 de son poids d'acide trichloracétique, homogénéisée, centrifugée.

La bile est déprotéinée par addition de 5 vol. de solution d'acide trichloracétique à 10 pour cent et centrifugée.

2) Extraction de la Chloroquine libre

Les solutions trichloracétiques déprotéinées précédentes sont alcalinisées nettement par une solution de NaOH 2N au bleu soutenu de

(*) - Appareil broyeur JOUAN, type Mixolabo

l'indicateur spectral B.R.P (CODEX 1937) , ce qui correspond à un pH 8,1 - 8,2.

La solution alcaline est alors épuisée , à deux reprises , avec 10 ml de dichloréthane purifié.

3) Hydrolyse chlorhydrique de la Chloroquine conjuguée

Une partie de la solution trichloracétique obtenue en (1) est additionnée du 1/10 de son volume de HCl concentré et chauffée à l'autoclave à 120° C pendant 30 minutes.

La solution hydrolysée, additionnée de 3 pour cent d'acide trichloracétique est centrifugée. Le culot est lavé avec quelques millilitres de solution d'acide trichloracétique à 10 pour cent, et les liquides centrifugés réunis soumis à un nouvel épuisement par le chloroforme d'abord, puis par le benzène de façon à éliminer les produits d'hydrolyse non basiques, acides ou phénoliques que l'expertise peut avoir à considérer.

La solution trichloracétique est ensuite alcalinisée et épuisée par le dichloréthane comme précédemment.

4) Complexation avec le méthyl-orange

Laver la phase organique, par agitation une minute, avec un volume égal d'eau distillée.

La phase organique , placée dans une ampoule à décanter , est additionnée de 0,5 ml de solution réactif de méthyl-orange et agitée énergiquement pendant 10 minutes.

Séparer parfaitement la phase organique qui a pu être teinte en orangé dans un tube à centrifuger, et après centrifugation, éliminer avec soins, par aspiration, toutes traces de la solution aqueuse de méthyl-orange. Filtrer encore la solution organique du complexe sur un fragment de coton hydrophile desséché, destiné à éliminer complètement toute trace de solution aqueuse.

Une partie aliquote de la solution organique du complexe est versée dans une petite ampoule à décanter et agitée énergiquement, pendant cinq minutes, avec 5 ml de HCl N/I. La solution aqueuse se colore en rouge violacé plus ou moins intense, correspondant à la dissociation du complexe et à la libération du méthyl-orange.

Séparer quantitativement la solution aqueuse colorée de méthyl-orange. Lire la densité optique à 515 mμ, à la rigueur avec un photomètre muni d'un écran convenable et à une dilution appropriée à la mesure précise.

5) Etalonnage de la courbe de spectrophotométrie

La multiplicité des opérations décrites entraîne d'inévitables pertes. Il en résulte que, pour obtenir un dosage correct, une courbe étalon des rapports densité optique des solutions résiduelles de méthyl-orange / concentration chloroquine doit être établie par points successifs. Les prises d'essais correspondantes, échelonnées entre 2 et 25 μg subissant toutes les opérations d'extraction et complexation. Il va sans dire qu'un témoin est effectué sans chloroquine et mesure la qualité des réactifs et des manipulations.

REMARQUES: Dans la technique originale de M. et P. CHAMBON préconisée pour le dosage de la Morphine, la complexation est précédée par une

estérification de l'hydroxyle libre de la morphine, nécessaire à la fois pour rendre la complexation possible et pour accroître la solubilité dans la phase organique.

Nous avons établi une courbe d'étalonnage, à partir de la Chloroquine base dissoute dans l'acide chlorhydrique N/10. Cette solution mère contenant 30 $\mu\text{g/ml}$ conservée au réfrigérateur nous permet de faire un témoin pour chaque détermination.

La densité optique est mesurée au spectrophotomètre électronique JOBIN-YVON, sous 1 cm d'épaisseur, à 515 $\text{m}\mu$.

VALEURS DE LA DENSITE OPTIQUE
EN FONCTION DE LA CONCENTRATION
EN CHLOROQUINE

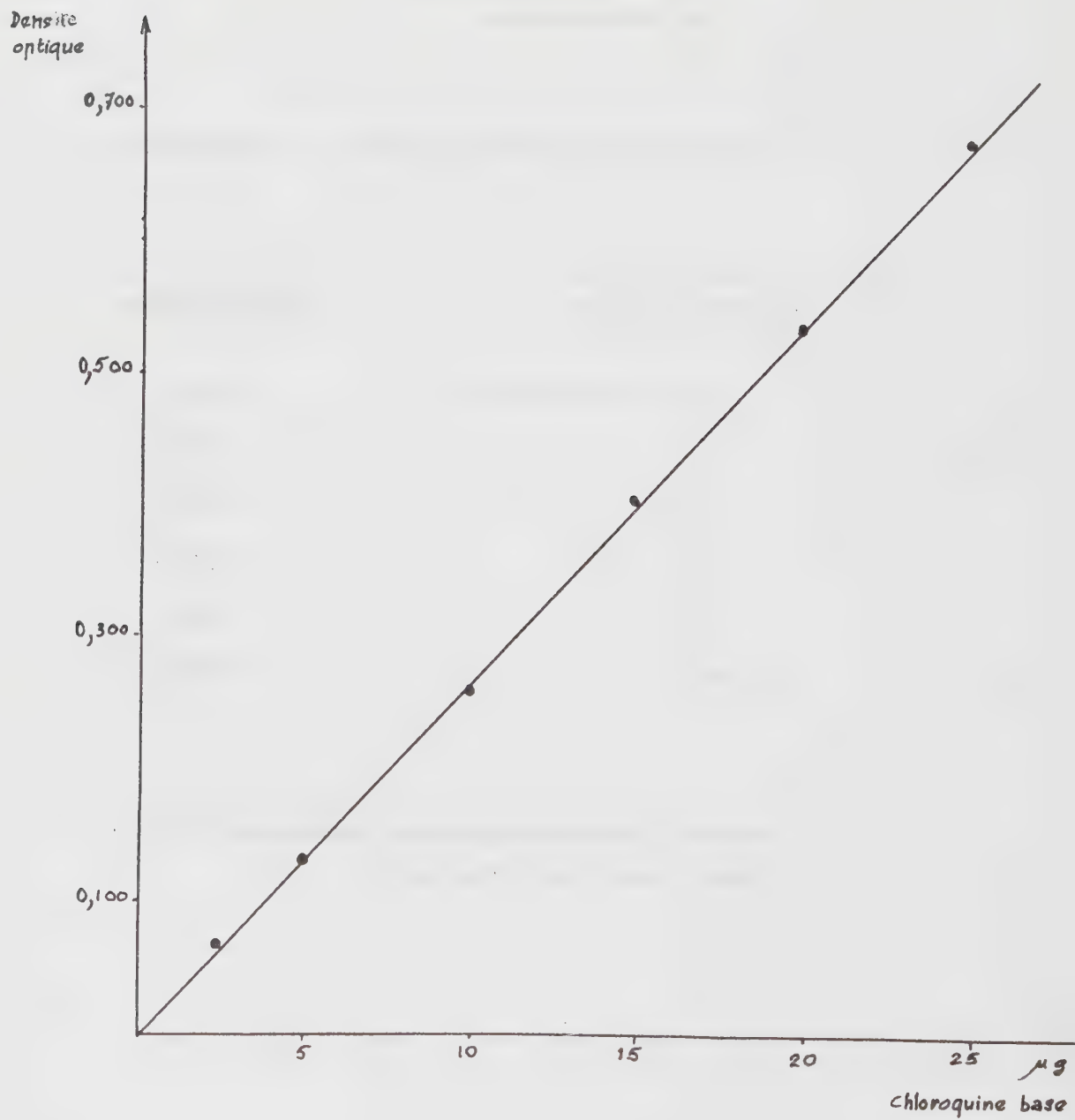
(Méthode colorimétrique de M. et P. CHAMBON)

<u>Chloroquine - base</u>	<u>Densité optique</u>
2,5 microgrammes	0,065
5	0,130
10	0,260
15	0,400
20	0,530
25	0,670

(Mesure au spectrophotomètre électronique JOBIN -
YVON , sous 1 cm d'épaisseur)

COURBE D'ETALONNAGE de la CHLOROQUINE

Méthode de M. et P. CHAMBON



B - METHODE SPECTROPHOTOMETRIQUE DIRECTE A 342 mμ

(Méthode de M. et P. CHAMBON, sans complexation avec le méthyl-orange)

Dans cette méthode, nous utilisons la même technique que celle de M. et P. CHAMBON, c'est-à-dire en passant par les phases successives de déprotéination extractive, d'extraction de Chloroquine libre et liée après hydrolyse acide à l'autoclave, mais sans recourir à l'opération de complexation.

Cette méthode étudiée en parallèle avec celle de M. et P. CHAMBON va nous permettre d'apprécier la spécificité de cette dernière.

1) Examen spectrophotométrique à 342 mμ

Une partie aliquote de la solution organique lavée dans la méthode de CHAMBON, en vue de complexation, est agitée énergiquement pendant 10 minutes avec 5 ml de HCl N/1. La solution chlorhydrique est ensuite séparée, centrifugée et examinée au spectrophotomètre dans l'ultra-violet à 342 mμ.

2) Etalonnage de la courbe spectrophotométrique

Nous avons établi une courbe d'étalonnage avec une solution chlorhydrique N/10 de Chloroquine contenant 30 μg de base/ml.

VALEURS DE LA DENSITE OPTIQUE EN FONCTION
DE LA CONCENTRATION EN CHLOROQUINE

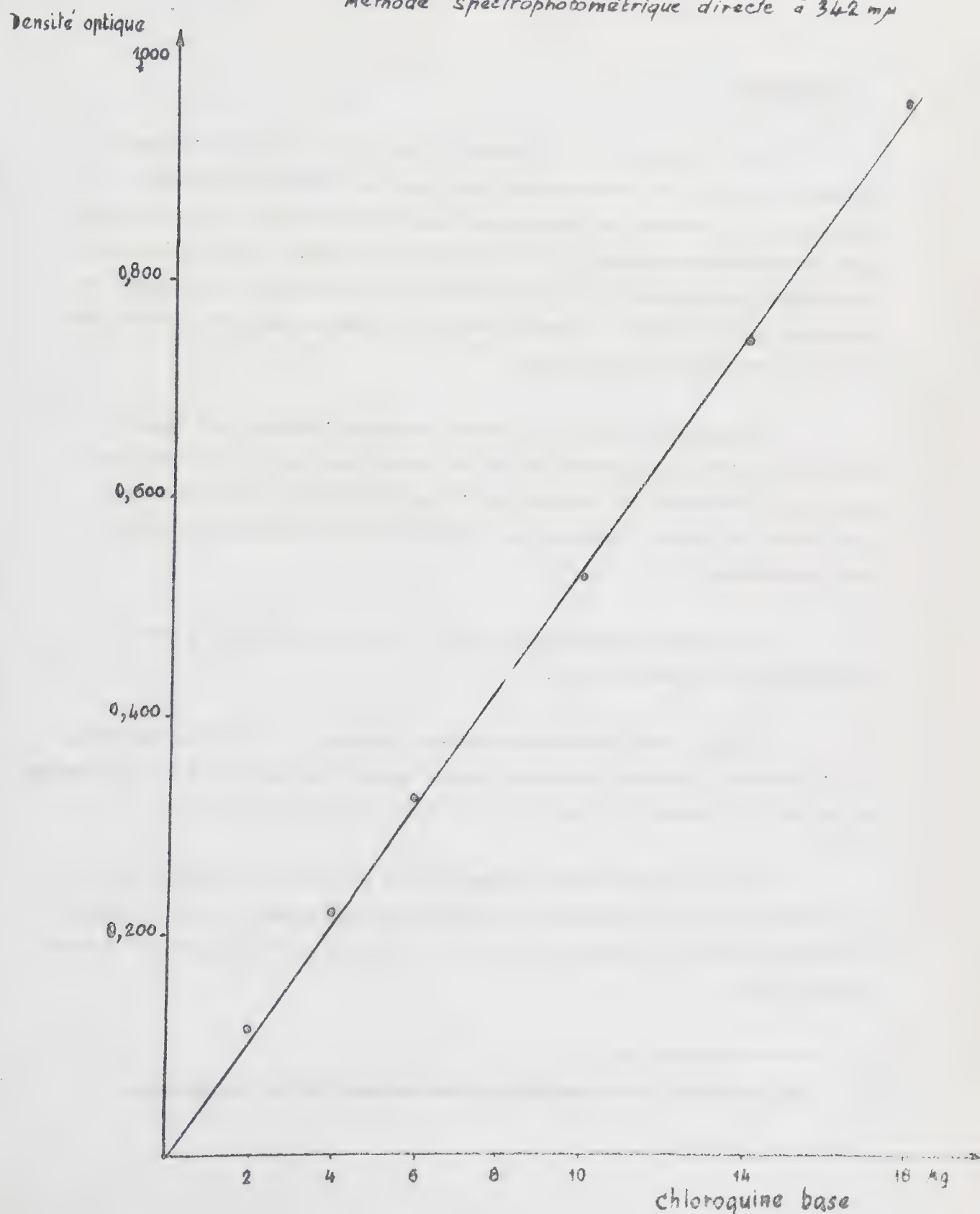
(Méthode spectrophotométrique à 342 mμ)

<u>Chloroquine-base</u>	<u>Densité optique</u>
2 microgrammes	0,115
4	0,220
6	0,325
10	0,530
14	0,750
18	0,970

(Mesure au spectrophotomètre électronique JOBIN-YVON ,
sous 1 cm d'épaisseur)

COURBE D'ETALONNAGE de la CHLOROQUINE

Méthode spectrophotométrique directe à 342 m μ



C - METHODE DE STAS-OTTO-OGIER

PRINCIPE

Cette méthode très classique repose sur le fait que l'alcool possède des propriétés dissolvantes très étendues pour les substances organiques, mais nulles et coagulantes pour les protéines ; les alcaloïdes sont plus facilement extraits en les salifiant en milieu acide. Les produits biologiques soigneusement broyés subissent une macération alcoolique et tartrique, puis une série de purifications successives par précipitation par l'alcool, filtration et distillation ^(°).

Le produit obtenu, absolument exempt d'alcool, est épuisé d'abord par l'éther de pétrole en milieu acide pour enlever les matières grasses et résineuses, et ensuite par l'éther éthylique en milieu acide, qui extrait les acides organiques, les phénols, les anhydrides d'acide, les glucosides.

Le dernier épuisement se fait, à plusieurs reprises, par le chloroforme en milieu alcalin.

Sur ces solutions chloroformiques réunies, on effectue le dosage de l'alcaloïde, selon le protocole exposé dans le paragraphe 4 de la méthode de M. et P. CHAMBON. Nous obtenons ainsi la Chloroquine libre.

Sur le liquide restant (queue de la méthode de STAS-OTTO) nous avons essayé de retrouver la Chloroquine conjuguée, par la technique d'hydrolyse acide à l'autoclave à 120°. Le produit d'hydrolyse est ensuite isolé et dosé.

(°) - Pour la distillation, nous avons utilisé un évaporateur rotatif BUCHI, type Rotavapor.

TECHNIQUE

La technique de STAS-OTTO-OGIER est exposée dans ses détails par le Professeur M. CHAMBON, dans le fascicule des Travaux Pratiques de Toxicologie de 4^e année de Pharmacie (Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de LYON).

II - EXPERIMENTATION CHEZ LE CHIEN

A - DOSAGE DE LA CHLOROQUINE DANS LES URINES ET DANS LES ORGANES

CHIEN I

Dans cette expérience , nous avons cherché à réaliser une intoxication suraiguë par la Chloroquine.

Nous avons pris un chien mâle de 15 kg , auquel nous avons injecté, par voie sous-cutanée, 30 mg/kg de poids corporel, de Chloroquine base dissoute en milieu chlorhydrique.

Après l'administration du médicament, l'animal est placé dans une cage dont le fond est aménagé de manière à pouvoir recueillir les urines. Le chien manifeste une extrême fatigue et meurt 20 minutes après l'injection.

L'autopsie a été pratiquée sur le chien 16 heures après sa mort. On recueille alors les différents viscères et liquides biologiques, et la carcasse a été abandonnée.

Pour la vessie, on prend soin de ligaturer l'uretère afin de prévenir toute perte d'urine. Dans le cas de la vésicule biliaire, la totalité de la bile ne peut être prélevée qu'après la ligature du canal cystique . D'autre part, pour conserver le contenu stomacal et intestinal, on doit s'assurer qu'avant le prélèvement , le cardia, le pylore, et les extrémités de l'intestin sont solidement ligaturés.

Tous les prélèvements mis en bocaux neufs, fermés et étiquetés selon les modalités d'une expertise toxicologique, sont conservés au réfrigérateur à + 4° C.

Avant tout dosage, le matériel et les réactifs doivent être vérifiés quant à leur propreté et pureté.

Pour limiter au maximum l'hydrolyse des formes conjuguées par la glucuronidase de l'organisme, les dosages dans l'urine et dans la bile sont commencés 24 heures environ après la mort de l'animal. Les autres dosages s'échelonnent sur trois semaines.

Résultats expérimentaux :

Les résultats obtenus, après dosage par la méthode de M. et P. CHAMBON, sont groupés dans le Tableau I.

Quels commentaires peut-on en tirer ?

Malgré la rapidité avec laquelle l'animal est mort, nous avons trouvé dans l'ensemble des viscères et liquides biologiques analysés, une quantité non négligeable de la Chloroquine conjuguée représentant le 1/6 de la forme libre. L'existence de cette forme conjuguée, dans ce cas, nous laisse penser que le mécanisme de détoxication de l'organisme a été déclenché dès l'introduction du toxique dans la circulation générale.

T A B L E A U I

DOSAGE DE LA CHLOROQUINE CHEZ LE CHIEN I

Poids: 15 kg

Dose : 30 mg/kg, soit 450 mg de Chloroquine-base
dissoute en milieu chlorhydrique

Mort : 20 minutes après injection sous-cutanée

Dosage: Méthode de M. et P. CHAMBON

ORGANES ou LIQUIDES BIOLOGIQUES			CHLOROQUINE en µg			Concen- tration en mg/kg
Poids total en grammes			Libre	Conjuguée	Totale	
Analyses 24 à 48 heures après la mort	URINE émise	150 g	150	5	155	1,03
	URINE vésicale	180	153	135	288	1,06
	BILE	19	traces	0	traces	
	SANG	1000	830	traces	830	0,83
Analyses échelonnées sur trois semaines	FOIE	430	2425	traces	2425	5,65
	REINS	127	2820	traces	2820	22,20
	RATE	40	307,4	356,6	664	16,60
	COEUR (muscle)	170	2799	847	3646	21,20
	POUMONS	320	1440	290	1730	5,40
	CERVEAU (substance grise)	20	30,6	0	30,6	1,53
	BULBE-CERVELET	20	30	86	116	5,80
	ESTOMAC (contenu)	590	1009	112	1121	1,90
	INTESTIN(contenu)	490	634,4	74,6	709	1,44
B I L A N			Total : 14,534 mg soit 3,20 % de la dose injectée			

Les voies naturelles d'élimination (urine et intestin) contiennent peu de toxique. Tandis que la forme conjuguée dans l'urine totale (vésicale et extériorisée) est égale à 46 pour cent par rapport à la forme libre qui y existe, une quantité relativement élevée de la Chloroquine libre et peu de conjugué sont observés au niveau de l'estomac et de l'intestin.

Il est à signaler d'une part, la presque absence au niveau de la bile, et d'autre part, l'extrême pauvreté de la forme conjuguée au niveau du foie et des reins. Par contre, les quantités les plus importantes de la Chloroquine se trouvent, et surtout à l'état libre, dans le sang, le foie, les reins et les poumons.

Mais le muscle cardiaque reste l'un des organes retenant le plus de toxique libre et également conjugué, dans le rapport 2799/847. Cette fixation massive de la Chloroquine à ce niveau pourrait expliquer les symptômes cardio-vasculaires observés au cours des intoxications par ce médicament.

Par ailleurs, la teneur élevée de ce dernier dans le muscle du coeur nous incline à penser que dans la musculature de la carcasse, pourrait se trouver la majeure partie du toxique, ce qui explique le déficit observé dans notre bilan. D'autre part, nous avons retrouvé à l'endroit de l'injection, sous la peau, une quantité non négligeable de la Chloroquine s'élevant à 40 mg. Il est donc probable qu'étant donnée la courte période séparant l'injection et la mort de l'animal, la diffusion du médicament à partir du milieu de stockage primitif, c'est-à-dire de l'espace sous-cutané où s'est faite l'introduction de la Chloroquine, est incomplète. Il s'en suit qu'une quantité relativement importante d'alcaloïde pourrait se trouver encore dans le tissu conjonctif lâche sous-cutané situé aux environs de l'endroit d'injection.

On doit noter aussi la proportion relativement élevée de la forme conjuguée dans la rate (116 pour cent par rapport à la forme libre) et plus encore dans le bloc bulbe-cervelet (290 pour cent par rapport à la forme libre). Cependant, la matière cérébrale contient relativement peu de Chloroquine.

Enfin, nous constatons que la méthode préconisée par M. et P. CHAMBON, tout à fait révolutionnaire dans la recherche toxicologique de la Morphine, est parfaitement valable pour le dosage de la Chloroquine. Cette méthode nous a permis d'isoler et de doser le toxique disséminé dans l'organisme sous ses deux formes libre et conjuguée. Cette dernière représente la seule preuve du passage et du métabolisme du toxique dans l'organisme, d'où son intérêt sur le double plan toxicologique et biologique.

C H I E N II

Dans cette nouvelle expérience, nous avons cherché à obtenir une intoxication aiguë , provoquée par une injection sous-cutanée de 15 mg/kg de Chloroquine base, dissoute en milieu chlorhydrique. Nous avons choisi une chienne de 14 kg qui, après l'administration du médicament, est placée, comme dans le cas précédent, au calme avec de l'eau à volonté.

L'intoxication ainsi provoquée est interrompue, après 22 heures, par le sacrifice de l'animal.

A l'autopsie, le prélèvement des viscères et liquides biologiques est effectué avec les mêmes précautions. Il est à noter que la rate est anormalement hypertrophiée, non par la Chloroquine, mais par les vers parasitaires qui s'y trouvent. La carcasse a été abandonnée.

La détermination de la Chloroquine dans les organes se fait par la méthode de M. et P. CHAMBON.

Résultats expérimentaux :

L'ensemble des résultats obtenus se trouve résumé dans le TABLEAU II .

T A B L E A U I I

DOSAGE DE LA CHLOROQUINE CHEZ LE CHIEN II

Poids : 14 kg, et de sexe femelle

Dose: 15 mg/kg, soit 210 mg de Chloroquine-base

dissoute en milieu chlorhydrique

Sacrifié: 22 heures après injection sous-cutanée

Dosage: Méthode de M. et P. CHAMBON

ORGANES ou LIQUIDES BIOLOGIQUES			CHLOROQUINE en µg			Concen- tration en mg/kg
Poids total en grammes			Libre	Conjuguée	Totale	
Analyses 24 à 48 heures après la mort	URINE	730g	9208,5	1315	10523,5	14,41
	BILE	10	40	20	60	6,00
	SANG	980	traces	173,5	173,5	0,177
Analyses échelonnées sur trois semaines	FOIE	340	7565,4	1164,1	8729,5	25,68
	REINS	68	19,3	433,7	453	6,66
	RATE	173	4180	1130	5310	30,35
	COEUR (muscle)	83	431,6	48,7	480,3	5,78
	POUMONS	218	955,7	traces	955,7	4,39
	BULBE-CERVELET	12	47	37	94	7,80
	CERVEAU (substance grise)	30	87,6	52,4	140	4,65
B I L A N			Total : 26,909 mg soit 12,81 % de la dose injectée			

De ces résultats, nous pouvons dégager les remarques suivantes:

Dans l'ensemble des prélèvements, la quantité de Chloroquine retrouvée dans les viscères croît avec la durée de survie de l'animal. Chez le Chien I, dont la survie est de 20 minutes, nous avons retrouvé, pour la totalité des viscères et liquides biologiques analysés, 3,20 % de la dose de Chloroquine injectée. Dans cette expérience où l'animal est sacrifié après 22 heures, ce pourcentage monte à 12,81.

Pour l'ensemble des produits analysés, on observe une quantité plus élevée de la forme conjuguée du toxique, l'organisme disposant de plus de temps pour effectuer le travail de conjugaison.

L'élimination de la Chloroquine, par la voie urinaire, se trouve considérablement augmentée. L'urine où prédomine la forme libre (9280 µg) sur la forme conjuguée (1315 µg), contient plus de 5 % de la dose administrée.

Cette prépondérance de la Chloroquine libre est encore observée d'une part, dans le foie, le coeur, les poumons qui sont des organes retenant le plus de toxique, et d'autre part, dans la bile et l'encéphale, beaucoup plus pauvres en alcaloïde.

Il est à noter que le sang contient presque uniquement la forme conjuguée, la forme libre n'y existant qu'à l'état de traces.

Enfin, la rate présente une rétention anormalement élevée du toxique sous les deux formes libre et conjuguée. L'état pathologique de cet organe fortement hypertrophié par des vers parasitaires semble être la cause de ce phénomène exceptionnel.

C H I E N III

Dans cette dernière expérimentation animale, nous nous sommes proposés plusieurs buts :

- 1) Etude de la répartition de la Chloroquine chez l'animal gravide, au cours d'une intoxication aiguë, et chez le fœtus.
- 2) Etude de la réabsorption intestinale de ce médicament.
- 3) Etudes comparées des méthodes de dosage :
 - Méthode colorimétrique de M. et P. CHAMBON
 - Méthode spectrophotométrique à 342 mμ
(Méthode de M. et P. CHAMBON sans complexation avec le méthyl-orange)
 - Méthode classique de STAS-OTTO-OGIER.

Nous avons pris une chienne gravide de 14,500 kg. à laquelle nous avons administré, par voie sous-cutanée, une dose de 15 mg/kg de Chloroquine-base dissoute en milieu chlorhydrique.

L'animal est sacrifié 24 heures après l'injection, par saignée de la carotide, après anesthésie au chloroforme.

A l'autopsie, nous trouvons un fœtus bien formé de 135 grammes qui sera étudié à part.

Le prélèvement des organes s'effectue toujours avec les mêmes soins que dans les cas précédents. La carcasse a été abandonnée.

1) ETUDE DE LA REPARTITION DE LA CHLOROQUINE CHEZ L'ANIMAL GRAVIDE

Nous avons utilisé, dans cette étude, la méthode spectrophotométrique directe à 342 m μ , qui est celle de M. et P. CHAMBON, mais sans complexation avec le méthyl-orange, pour la détermination de la Chloroquine.

Résultats expérimentaux :

Les résultats obtenus sont groupés dans le TABLEAU III.

Dans cette expérience, la durée de survie de l'animal est prolongée à 24 heures, au lieu de 22 heures comme dans le cas d'intoxication aiguë précédent (Chien II). L'examen de ces résultats nous permet de faire quelques commentaires:

Dans l'ensemble des prélèvements, une prolongation de survie de deux heures permet une pénétration plus grande de la Chloroquine dans les organes et à la fois une élimination plus importante du toxique par les voies naturelles, ce qui paraît être en liaison avec une diffusion à partir du stockage primitif de l'alcaloïde, en partie du lieu d'injection et probablement dans la musculature de la carcasse.

La forme conjuguée se trouve considérablement augmentée dans l'urine qui contient plus que le 1/4 de la quantité totale d'alcaloïde retrouvée. D'autre part, le dosage séparé dans l'urine émise dans les 14 heures suivant l'administration, montre une concentration relativement élevée du toxique (8510 μ g), avec prédominance de la forme libre sur la forme conjuguée, dans le rapport de 7/1, ce qui ne s'oppose pas à la forte teneur, presque exclusive en forme libre, de la Chloroquine dans le sang dans les premières heures après l'introduction du médicament par voie parentérale (Chien I).

T A B L E A U III

DOSAGE DE LA CHLOROQUINE CHEZ LE CHIEN III

Sexe : Femelle

Etat : GRAVIDE, au dernier quart de la gestation

Poids: 14,500 kg

Dose : 15 mg/kg soit 217,5 mg de Chloroquine-base
dissoute en milieu chlorhydrique

Sacrifié: 24 heures après injection sous-cutanée

Dosage : Méthode spectrophotométrique à 342 mμ

ORGANES ou LIQUIDES BIOLOGIQUES			CHLOROQUINE en μg			Concen- tration en mg/kg
Poids total en grammes			Libre	Conjuguée	Totale	
Analyses 24 à 48 heures après la mort	URINE émise après 14 heures	740	7449,3	1060,7	8510	11,50
	URINE vésicale	615	2031	1965	3996	6,50
	BILE	22	88	88	176	8,00
	SANG	1040	traces	390	390	0,375
Analyses échelonnées sur trois semaines	FOIE	482	13251	2354	15605	32,37
	REINS	86	526,2	736,8	1263	14,68
	RATE	48	579,2	43	622,2	12,96
	COEUR (muscle)	140	979	142	1121	8,01
	POUMONS	250	2021	229	2250	9,00
	BULBE-CERVELET	15	58,7	92,8	151,5	10,10
	CERVEAU (substance grise)	20	130,6	121,4	252	12,60
	ESTOMAC(contenu)	447	173,2	132,8	306	2,08
	INTESTIN(contenu)	687	2277	2218	4495	6,54
MATIÈRES FÉCALES (*) 200			1914	86	2000	10,00
B I L A N			Total : 41,117 mg soit 18,90 % de la dose injectée			

(*) - Les matières fécales ont été extériorisées au cours de la période terminale de l'anesthésie précédant le sacrifice.

Par contre, l'analyse dans l'urine vésicale prélevée, lors de l'autopsie, 24 heures après l'injection, révèle une quantité nettement inférieure du toxique dont les deux formes libre et conjuguée sont sensiblement égales. Ceci serait dû vraisemblablement à la concentration modeste de l'alcaloïde, presque tout à l'état conjugué, se trouvant dans le sang correspondant à la même période du prélèvement.

Cependant, la bile et l'intestin où les formes libre et conjuguée demeurent presque à égalité, éliminent près de 12 % de la quantité retrouvée.

Des concentrations plus élevées en formes libre et conjuguée sont observées dans le foie, les poumons, les reins et l'encéphale. Si l'aptitude du foie à fixer la plus grande quantité du toxique est bien connue par son rôle prépondérant dans la détoxication de l'organisme, il est intéressant de souligner, ici encore, la surcharge cardiaque en Chloroquine. En effet, le coeur retient, dans tous les cas, une quantité de toxique relativement aussi importante que celle trouvée dans les reins.

La rate présente une concentration normale d'alcaloïde avec prédominance des formes libres, mais peu de conjugués.

Enfin, l'état de gravidité de l'animal ne semble pas avoir une influence particulière sur la répartition de la Chloroquine dans l'organisme.

2) ETUDE DE LA REABSORPTION INTESTINALE DE LA CHLOROQUINE

L'importante rétention de la Chloroquine dans le foie (40 % de la quantité totale d'alcaloïde retrouvée) nous permet de penser logiquement que la principale voie d'élimination du toxique serait la voie digestive. La comparaison des valeurs trouvées dans les urines (12506 µg) d'une part, et celles dans l'intestin (4495 µg) et dans les matières fécales (2000 µg) d'autre part, nous montre qu'il n'en est rien. La Chloroquine est donc éliminée, en majeure partie, par la voie urinaire.

Pour expliquer ce phénomène, il nous faut envisager la théorie de la réabsorption intestinale : une grande partie du toxique provenant du foie, que nous aurions dû retrouver dans l'intestin, par l'intermédiaire de la bile, est réabsorbée lors de son passage dans le tube digestif, en vue de son élimination par les reins. Ainsi est accompli le cycle entéro-hépatique.

Il nous apparaît , dès lors , intéressant de savoir à quel niveau de l'intestin a lieu la réabsorption de la Chloroquine ?

Pour cette étude, nous avons analysé séparément le contenu et les eaux de lavage de la muqueuse de chacune des parties de l'intestin.

Résultats expérimentaux :

L'ensemble des résultats se trouve dans le TABLEAU IV .

T A B L E A U I V

INTESTIN GRELE avec contenu : 417 grammes

Longueur : 2 mètres

Matières contenues	Poids de la prise d'essai	Distance par rapport au pylore	CHLOROQUINE en µg			Concen- tration en mg/kg
			Libre	Conjuguée	Totale	
DUODENUM	15 g	5 cm	35,2	13,5	48,7	3,25
JEJUNUM	17 g	100 cm	80	42,6	122,6	7,21
ILEON	15 g	195 cm	38	16,3	54,3	3,62

GROS INTESTIN avec contenu : 270 grammes

Longueur : 0,60 mètres

Matières contenues dans la	Poids de la prise d'essai	Distance par rapport à la valvule iléo-caecale	CHLOROQUINE en µg			Concen- tration en mg/kg
			Libre	Conjuguée	Totale	
PROXIMALE	14 g	5 cm	48,8	48,8	97,6	6,98
MEDIANE	22 g	30 cm	74,3	170,9	245,2	11,14
DISTALE	24 g	55 cm	80,5	153,7	234,2	9,76

L'élimination par la voie digestive d'un toxique administré par voie parentérale se fait normalement par l'intermédiaire de la bile qui permet son évacuation, du foie vers la lumière intestinale, au niveau du duodénum.

Cependant, d'après les résultats obtenus, le duodénum et l'iléon se révèlent comme les deux parties de tout l'intestin où l'on observe les concentrations les plus faibles de Chloroquine. Il semble donc permis de penser que la réabsorption de ce médicament se manifeste activement à ces deux niveaux de l'intestin grêle.

D'autre part, on doit signaler une nette prédominance de la forme conjuguée sur la forme libre dans le gros intestin qui est relativement beaucoup plus riche en alcaloïde que l'intestin grêle. Dans ce dernier, c'est la forme libre qui est prépondérante, mais la quantité de conjugué reste cependant notable. Par ailleurs, si l'on examine les valeurs trouvées dans les différentes parties de l'intestin, depuis le duodénum jusqu'à la partie distale terminale, on observe une progression assez régulière de la forme conjuguée par rapport à la forme libre.

L'existence de l'alcaloïde conjugué dans l'intestin nous laisse penser que cet organe joue probablement un rôle important dans la conjugaison des toxiques.

3) ETUDES COMPAREES DES METHODES DE DOSAGE

Nous allons essayer, pour un organe donné, les trois méthodes de dosage proposées :

- Méthode colorimétrique de M. et P. CHAMBON
- Méthode spectrophotométrique à 342 mμ
(Méthode de M. et P. CHAMBON, sans complexation avec le méthyl-orange)
- Méthode classique de STAS-OTTO-OGIER pour l'extraction et dosage ultérieur par complexation.

Nous avons procédé au dosage dans le foie de la chienne III, simultanément avec ces trois méthodes.

Résultats expérimentaux :

T A B L E A U V

ORGANE Poids	Méthode Spectrophotométrique			Méthode de M. et P. CHAMBON			Méthode STAS-OTTO	
	CHLOROQUINE en µg			CHLOROQUINE en µg			CHLOROQUINE en µg	
	Libre	Conjuguée	Totale	Libre	Conjuguée	Totale	Libre	Conjuguée(*)
FOIE 482 g	13251	2354	15605	10425	1987	12412	5398	295

(*) - Liqueurs résiduelles déjà épuisées selon STAS et analysées par la méthode de M. et P. CHAMBON après hydrolyse.

Quelles sont les conclusions qu'il faut tirer de ces résultats ?

Tout d'abord, nous remarquons que la méthode spectrophotométrique directe à 342 mµ, donne des valeurs les plus fortes. La méthode colorimétrique de M. et P. CHAMBON vient après avec un écart d'environ 20 pour cent. Les résultats obtenus par la méthode classique STAS-OTTO sont nettement beaucoup plus faibles. Cette dernière, tout en gardant sa valeur dans la recherche systématique des toxiques organiques, reste insuffisante dans le dosage de la Chloroquine. Ainsi, dans les liqueurs aqueuses résiduelles déjà épuisées de la méthode de STAS-OTTO, l'hydrolyse acide à l'autoclave, selon la technique de M. et P. CHAMBON, permet de révéler une quantité non négligeable de toxique conjugué.

Au cours de nos expériences, la méthode spectrophotométrique et la méthode de complexation au méthyl-orange, selon BRODIE et M. et P. CHAMBON, nous ont donné des résultats satisfaisants. Cependant, bien que la méthode spectrophotométrique soit spécifique à 342 m μ correspondant au plus grand maximum d'absorption de la Chloroquine, il faut être très prudent dans l'appréciation de ses valeurs. La moindre impureté provenant des milieux biologiques pourrait interférer dans le dosage.

La méthode de M. et P. CHAMBON, basée sur la formation du complexe entre la base amine tertiaire et le colorant sulfonique qu'est le méthyl-orange, permet un dosage sélectif de l'alcaloïde-base. En effet, après son extraction, la Chloroquine, au lieu d'être examinée directement au spectrophotomètre, subit une complexation avec le méthyl-orange. Seule l'intensité de la coloration rouge violacé provenant de la dissociation du complexe en milieu acide sera mesurée au photomètre. Toutes ces opérations constituent une purification hautement appréciable d'alcaloïde, contribuant ainsi à une plus grande sécurité dans le dosage.

En toxicologie, pour des impératifs de précision et à cause de ses grandes responsabilités, il est préférable d'utiliser la méthode de M. et P. CHAMBON qui nous paraît digne de confiance dans la détermination de la Chloroquine ; du reste, l'alcaloïde séparé après dissociation du complexe coloré peut servir à toutes les identifications nécessaires.

Ainsi que nous l'avons déjà indiqué, nous rapporterons plus loin les dosages effectués sur le fœtus prélevé à l'autopsie de la chienne
III.

B - IDENTIFICATION DE LA CHLOROQUINE DANS LES URINES ET DANS LES ORGANES

L'étude de la distribution de la Chloroquine à travers les différents organes et liquides biologiques nous a montré que cette drogue est disséminée sous les deux formes : libre et conjuguée.

Dans une expertise toxicologique, l'identification d'une façon certaine du produit responsable par ses réactions caractéristiques est aussi importante que son dosage précis. Car l'expert sera amené à discuter la présence du toxique.

Nous allons donc pratiquer l'isolement de la Chloroquine à partir de l'urine ou de divers organes, puis la caractériser par la technique de chromatographie et par ses réactions colorées.

1) ISOLEMENT DE LA CHLOROQUINE

Nous avons vu que, dans la méthode de dosage de M. et P. CHAMBON, après l'extraction de l'alcaloïde-base en milieu alcalin par le dichloréthane, le dosage se pratique sur une partie aliquote de cette solution organique dont le restant va nous servir à son identification.

Le dichloréthane contenant la Chloroquine-base est évaporé à sec et repris par quelques gouttes de chloroforme purifié qui seront déposées sur le papier de chromatographie.

2) PROBLEME D'ALTERATION DES ALCALOIDES PAR LES OXYDANTS DES SOLVANTS

L'altération des alcaloïdes par les oxydants présents éventuellement dans les solvants organiques a été signalée par le Professeur M. CHAMBON, dans une conférence du IX^e Congrès des Sociétés de Pharmacie de France. Ceci nous incite à la prudence et nous montre combien il est important, dans un travail toxicologique, de vérifier et de contrôler la pureté des solvants avant leurs usages. Il est donc nécessaire d'utiliser exclusivement le chloroforme et le dichloréthane lavés, séchés et redistillés. L'éther doit être, au préalable, desséché et déperoxydé sur sodium.

En effet, sous l'action des oxydants présents dans les solvants, les alcaloïdes sont susceptibles de se transformer en aminoxydes dont les propriétés physico-chimiques sont complètement différentes de celles du produit de départ. En particulier, l'hydrosolubilité des aminoxydes constitue une perte considérable au cours des lavages avec de l'eau distillée.

Pour plus de sécurité, dans notre travail d'identification de la Chloroquine à partir des produits biologiques, par la technique chromatographique, nous avons mis un témoin supplémentaire : l'aminoxyde de chloroquine.

La préparation de cet aminoxyde se fait par la méthode de POLONOVSKI (96) : La Chloroquine base est oxydée par le peroxyde d'hydrogène en solution concentrée (110 volumes). Après évaporation, le résidu est épuisé par l'éther privé d'hydroperoxydes par traitement au sodium qui élimine la base non attaquée. Le résidu repris par quelques gouttes d'eau distillée est prêt à être déposé sur les chromatogrammes.

3) IDENTIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

La chromatographie sur papier, complétée par quelques réactions caractéristiques, constitue l'une des techniques précises dans l'identification d'un alcaloïde.

On sait que, pour un système de solvant donné, le R_f d'un alcaloïde est lié aux conditions expérimentales, telles que la température, le temps, la nature du papier. L'emploi des témoins déposés sur la ligne de départ, côte-à-côte avec le produit à identifier, sur la même bande du papier permet de réduire au minimum l'influence de ces facteurs variables. Dans ce cas, la mesure du déplacement de la substance étudiée par rapport au déplacement du témoin constitue une appréciation plus sûre que la mesure du R_f .

C'est dans ces conditions que notre travail de chromatographie a été conduit.

Nous avons utilisé la méthode de MUNIER (88) sur papier WHATMAN N°1 imprégné d'une solution M/5 de phosphate monopotassique (27,2 g/l), puis séché.

Après un développement de 15 heures par le butanol saturé d'eau, par voie ascendante, le chromatogramme est séché, ensuite examiné en lumière ultra-violette, et enfin révélé par immersion ou par pulvérisation avec les réactifs appropriés.

1° - Examen en lumière ultra-violette

Le chromatogramme bien séché est exposé sous les rayons d'une lampe ultra-violette à 365 m μ . Ce moyen physique permet de déceler des alcaloïdes spontanément fluorescents. La Chloroquine y présente une tache violette pâle, tandis que la Quinine

et l'Amodiaquine donnent respectivement des taches bleue et jaune .

2° - Révélation par une solution d'iode à saturation dans l'éther de pétrole.

Ce réactif utilisé par M. CHAMBON offre une très grande finesse de discernement : les spots des alcaloïdes sont localisés en taches jaune foncé bien limitées et sans bavures. La bande ainsi révélée, par immersion, présente l'avantage de pouvoir servir ultérieurement à d'autres différenciations dans des réactifs différents.

Avec ce réactif, la Chloroquine donne un spot jaune foncé à contour net, sur fond jaune pâle.

3° - Réactif de DRAGENDORFF (Formule de François et Seguin)

Avec les alcaloïdes , ce réactif révèle, par pulvérisation, des taches rouge orangé sur un fond orange.

La Chloroquine, la Quinine et l'Amodiaquine donnent des taches de même coloration rouge orangé sans distinction.

4° - Réactif d'iodoplatinate de potassium

Les taches de la Chloroquine, de la Quinine et de l'Amodiaquine révélées avec ce réactif sont d'un violet foncé et à bord très diffus.

5° - Réactif de Chlorure de Cobalt

La VIII^e édition de la Pharmacopée française a indiqué pour l'identification de l'Amodiaquine, un réactif spécifique dont la composition est la suivante:

Chlorure de Cobalt	6,8
Thiocyanate d'ammonium	4,3
Eau distillée	q.s.p. 100

Avec l'Amodiaquine, il apparaît une tache verte.

Le même réactif, essayé avec la Chloroquine, donne une tache bleue persistante.

6° - Réaction au ferricyanure ferrique adaptée à la révélation sur papier phosphaté par M. et P. CHAMBON.

Cette technique se pratique par immersion de la bande dans une solution extemporanée de chlorure ferrique alcoolique (chlorure ferrique : 0,20 - Alcool absolu : 3 - Ether exempt de peroxydes : 15), puis séchage une à deux minutes et enfin pulvérisation d'une solution extemporanée alcoolique de ferricyanure de potassium. Elle permet de révéler les taches des alcaloïdes phénoliques.

Amodiaquine (à fonction phénol) : tache bleue

Chloroquine (pas de fonction phénol) : pas de coloration.

Résultats expérimentaux

Sur papier WHATMAN N°1 phosphaté, avec le butanol saturé d'eau, nous avons obtenu les R_f suivants : TABLEAU VI.

TABLEAU VI

Nature du produit	Valeur du R_f
CHLOROQUINE	0,095
AMINOXYDE de CHLOROQUINE	0,25
HYDROXYCHLOROQUINE	0,065
AMODIAQUINE	0,25
QUININE	0,84

Les R_f obtenus avec les produits à identifier, Chloroquine libre et Chloroquine libérée après hydrolyse acide, extraits à partir des urines, de la rate, et des poumons, correspondent à celui de la Chloroquine-base.

Nous n'avons pas décelé des taches qui réagissent avec le réactif de ferricyanure ferrique exposé.

4) IDENTIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHES MINCES

La technique de chromatographie sur couches minces, réputée par sa rapidité d'exécution, et sa simplicité d'opération, a été largement utilisée dans de nombreux domaines. Nous nous proposons de l'étudier en vue d'identifier la Chloroquine dans les produits biologiques.

Nous avons fait des essais avec les deux absorbants couramment utilisés : l'alumine et le gel de silice.

1° - Alumine

Nous avons utilisé l'Alumine G MERCK pour la préparation des plaques (15 g alumine - 50 ml eau) qui seront ensuite activées pendant 30 minutes entre 105 et 120° C.

Il est à noter que l'Alumine G MERCK a une réaction basique.

Résultats expérimentaux

Les taches obtenues avec la Chloroquine, sur couches d'alumine et par développement dans le chloroforme, ne sont pas nettes et présentent de longues traînées.

2° - Gel de silice

Nous avons préparé des couches avec le gel de silice G MERCK dont les suspensions à étaler s'obtiennent en malaxant une partie en poids de gel G avec deux parties en volume d'eau distillée. Les plaques ainsi préparées présentent un pH 5 environ.

a) Sur ces couches, nous avons essayé plusieurs systèmes de solvants généralement utilisés pour séparer les alcaloïdes (101).

Système 1 : Chloroforme - Méthanol (9-1)

Système 2 : Ethanol - Dioxane - Benzène - Ammoniaque
(5-40-50-5)

Système 3 : Chloroforme - Diéthylamine (9-1)

Système 4 : Benzène - Acétate d'éthyle - Diéthylamine
(7-2-1)

Résultats expérimentaux :

TABLEAU VII

Nature du produit	Valeur du R_f dans le système solvant			
	1	2	3	4
CHLOROQUINE	0,03	0,025	0,90	0,65
AMINOXYDE de CHLOROQUINE	0,06	0	0,075	0,025
HYDROXYCHLOROQUINE	0,02	0,01	0,055	0,20
AMODIAQUINE	0,30	0,20	0,97	0,80

Après plusieurs essais répétés, nous sommes arrivés à la conclusion que ces systèmes ne sont pas reproductibles.

RANDERATH (101) a remarqué que le gel de silice G a une réaction acide, de sorte que les bases sont retenues au point de départ par suite de la formation des sels, quand on emploie des solvants neutres. Il a suggéré que les substances basiques peuvent être chromatographiées, dans ce cas, par l'utilisation des plaques rendues basiques ou tamponnées.

b) Nous avons été amenés à essayer des plaques de silicagel G modifié par une solution tampon de pH 9.

Acide borique	48 g
Hydroxyde de sodium	15 g
Eau distillée q. s. p.	1 litre

La préparation des plaques se fait par malaxation de 30 g de silicagel G avec 60 ml de la solution tampon de pH 9. La couche de Silicagel ainsi obtenue passe du pH 5 au pH 7.

Trois systèmes de solvants ont été essayés avec ces couches de gel de silice modifiées.

Système 1: Méthanol

Système 2: Butanol - Acide acétique - Eau (4-1-5)

Système 3: Butanol - Acide acétique - Eau (10-1-5).

Résultats expérimentaux : TABLEAU VIII .

TABLEAU VIII

Nature du produit	Valeur du R_f dans le système		
	1	2	3
CHLOROQUINE	0,17	0,30	0,20
AMODIAQUINE	0,40	0,42	0,30
QUININE	0,35	0,50	0,50
QUINIDINE	0,35	0,55	0,50

D'après ces essais, les couches de Silicagel G ainsi modifiées permettent une bonne séparation des quatre anti-malariques utilisés, sauf la Quinine et la Quinidine qui ont presque le même R_f . Mais, elles sont peu adhérentes aux plaques et forment souvent, au cours d'opération, des boursofflures qui finissent par s'éclater, ce qui empêche la bonne marche du solvant.

c) Un autre essai a été pratiqué avec des couches de Silicagel G alcalinisées par une solution de soude N/10 (30 g de Silicagel G avec 60 ml de NaOH N/10). Le développement se fait avec un solvant neutre : le méthanol.

Résultats expérimentaux ::

Cette technique nous permet d'obtenir des couches plus adhérentes et d'arriver à des résultats reproductibles.

TABLEAU IX

Nature du produit	R _f moyen	Nombre de tache secondaire
CHLOROQUINE	0,20	0
AMINOXYDE de CHLOROQUINE	0,40	0
HYDROXYCHLOROQUINE	0,45	0
AMODIAQUINE	0,70	0
QUININE	0,57	0
QUINIDINE	0,60	1

d) La révélation des taches se fait avec des réactifs suivants :

- Le réactif à l'iodoplatinate de potassium donne, avec la Chloroquine, une tache violette dont les contours ne sont pas bien limités.

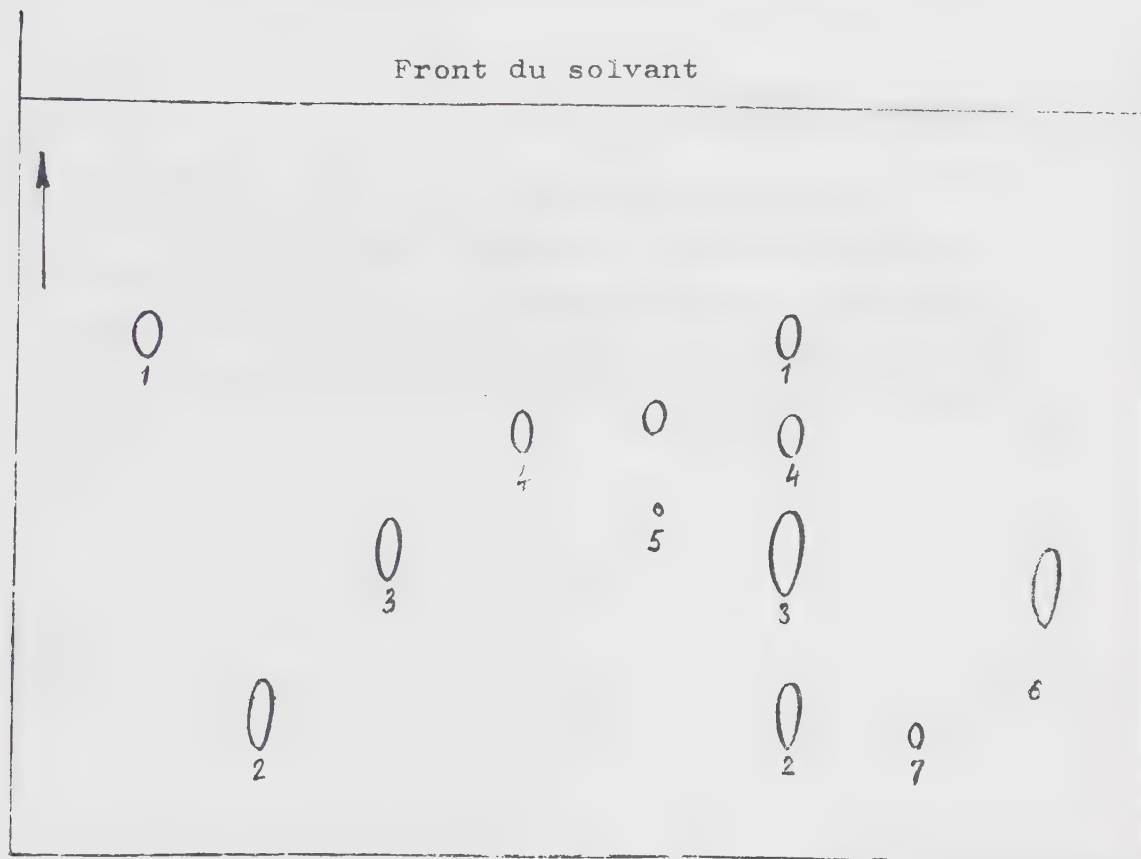
- Le réactif de BURGER (21) qui est celui de DRAGENDORFF modifié par MUNIER (89) et additionné d'une solution de chlorure de baryum à 20 pour cent, forme, en présence de la Chloroquine, une tache rouge orangé sur un fond jaune clair.

CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE DE SILICAGEL G

tamponnée à 1'Hydroxyde de Sodium N/10

Solvant: Méthanol

Révélation au réactif de Bürger



1. Amodiaquine
2. Chloroquine
3. Hydroxychloroquine
4. Quinine
5. Quinidine
6. Aminoxyde de Chloroquine
7. Produit isolé de la rate

e) Essais d'identification de la Chloroquine dans des produits biologiques.

Nous avons extrait la Chloroquine à partir de l'urine et de la rate de la chienne III, suivant la technique utilisée dans l'étude de la chromatographie sur papier.

Résultats expérimentaux

La solution chloroformique du produit à identifier est déposée sur une couche de Silicagel G alcalinisée par la soude N/10. Après développement par le méthanol, et révélation par le réactif de BURGER, nous avons obtenu une tache dont le R_f correspond à celui de la Chloroquine base.

C - IDENTIFICATION DU DERIVE DE CONJUGAISON DE LA

CHLOROQUINE DANS LES URINES

Inspirés des travaux de SEIBERT (110) et de WOODS (129, 130) sur la conjugaison de la Morphine avec l'acide glycuronique, nous allons appliquer à l'étude du glycuronide de la Chloroquine ces techniques qui consistent en une absorption, par chromatographie sur colonne, du dérivé conjugué sur la poudre de cellulose et en une série de purifications par le méthanol et par chromatographie de partage sur papier.

Notre but est d'isoler le dérivé conjugué dans l'urine des chiens traités à la Chloroquine, et d'identifier la molécule responsable de la conjugaison et le toxique lui-même après hydrolyse acide ou enzymatique.

1) ISOLEMENT DU DERIVE CONJUGUE

Cette opération comprend plusieurs phases :

1° - Destruction de l'urée

100 ml d'urine amenée à pH 7,4 par l'addition du carbonate monosodique sont triturés au mortier avec 3 g d'uréase. Le mélange est porté à 37° C pendant 1 heure 30, puis laissé refroidi. Après centrifugation et filtration, le filtrat est concentré dans le vide à faible température (50 à 60° C environ ^(*)), puis desséché dans un dessiccateur à acide sulfurique.

(*) - L'opération de concentration a été effectuée à l'aide d'un appareil automatique : évaporateur rotatif BUCHI, type Rotavapor.

2° - Purification

Sur le produit sec ainsi obtenu, nous allons procéder à la purification par passage à travers une colonne de chromatographie qui présente les caractéristiques suivantes :

longueur de la colonne : 1 mètre

allonge : 17 mm de diamètre intérieur

760 mm de haut

support de chromatographie : Poudre de cellulose

(Zellulosepulver N° 123 für Säulenchromatographie

- Carl SCHLEICHER und SCHULL, Dassel/Kr. Einbeck)

Pour remplir la colonne, on prépare une bouillie de poudre de cellulose avec un mélange n-butanol-acide acétique-eau (40-10-20). Après le tassement, la colonne de cellulose ne doit pas dépasser 40 cm de haut.

L'extrait urinaire desséché est trituré avec le mélange précédent. Après centrifugation, le liquide surnageant est passé sur la colonne où le niveau supérieur de la solution est soumis à une pression de 70 à 80 mm de mercure, à l'aide d'un système d'allonge.

Les 100 premiers millilitres sont rejetés, et on recueille les 150 ml suivants qui seront évaporés à sec, toujours dans le vide et à faible température. Le résidu est repris, à deux reprises, avec 2 ml d'eau distillée froide. Le liquide surnageant, après centrifugation, est ajouté à 20 ml de méthanol froid. On centrifuge de nouveau pour éliminer le dépôt salin qui a pu se former. Le liquide obtenu est évaporé à sec, et on recommence le même traitement.

Le résidu est traité, par deux fois, avec 20 ml de méthanol à l'ébullition pendant 5 minutes. Les solutions méthanoliques réunies

sont évaporées sous pression réduite. Le résidu est repris avec 4 ml d'eau distillée auxquels sont additionnés 10 ml de méthanol froid. Le dépôt est éliminé par centrifugation et le liquide surnageant est réduit à un faible volume.

La solution concentrée obtenue est alors chromatographiée par voie ascendante sur papier WHATMAN N°1 avec un système de solvant: n-butanol-acide acétique-eau (10-3-4,5). Le dépôt des taches se fait en une longue barre sur une large bande de papier. On prendra soin de mettre parallèlement un témoin de Chloroquine base sur la même feuille.

Après développement, une fine bande de chromatogramme est révélée à l'iode. Nous avons observé un spot dont le R_f est égal à 0,48. Dans les mêmes conditions, la Chloroquine base donne un R_f de 0,72.

On découpe la bande du spot correspondant au glycuronide de la Chloroquine ($R_f = 0,48$). On l'élue avec de l'eau distillée. L'éluat concentré est rechromatographié suivant la même technique.

2) IDENTIFICATION DE LA FORME CONJUGUEE

1° - Caractérisation du groupe basique

a) Par hydrolyse acide

Une partie de l'éluat du spot de R_f 0,48 est additionnée de 1/10 de son volume d'acide chlorhydrique concentré et passée à l'autoclave à 120° ; pendant 30 minutes. Cette hydrolyse permet de scinder la liaison de conjugaison et de libérer le toxique libre.

La Chloroquine libérée est extraite de la solution aqueuse par

le dichloréthane en milieu alcalin. La phase organique est évaporée sous pression réduite et le résidu est repris par quelques gouttes de chloroforme purifié et lavé qui seront déposées sur du papier WHATMAN N°1 phosphaté. Le développement chromatographique se fait, par voie ascendante, dans le butanol saturé d'eau, selon la technique de MUNIER.

Après révélation par des réactions colorées déjà exposées, nous avons pu identifier le groupe basique libéré comme Chloroquine base par son R_f correspondant à celui du témoin.

Sur un autre chromatogramme, dans les mêmes conditions, nous avons utilisé le réactif du ferricyanure ferrique (27) pour révéler éventuellement la fonction phénol dans le groupe basique libéré des conjugués de la Chloroquine. Mais la réaction est nettement négative, ce qui prouve que la molécule n'a pas été hydroxylée au cours de son passage dans l'organisme.

b) Par hydrolyse enzymatique

Parallèlement à l'hydrolyse acide, nous avons pratiqué, dans une autre partie de l'éluat du conjugué isolé, un essai d'hydrolyse enzymatique par la β -glycuronidase qui agit sélectivement sur les glycuronides.

L'éluat ajusté à pH 5, est additionné de 10.000 unités de β -glycuronidase. On y ajoute 5 ml de tampon acéto-acétique. Le mélange est incubé 24 heures à l'étuve à 37°C. On centrifuge et le liquide surnageant subit la même extraction que l'hydrolyse acide.

La chromatographie de l'extrait organique, selon la technique de MUNIER, nous a permis d'isoler et d'identifier l'alcaloïde libéré comme Chloroquine base. Cet essai positif nous apporte une preuve de l'existence du glycuronide de la Chloroquine.

2° - Caractérisation de la forme conjuguée

La révélation et le dosage des conjugués glycuroniques peuvent être effectués par l'utilisation de la réaction au naphtorésorcinol de FISHMAN (42), ou de celle au carbazole de DISCHE (36).

a) - Méthode de FISHMAN

Cette méthode permet de mettre en évidence et de doser sélectivement l'acide glycuronique entrant dans la conjugaison.

L'acide glycuronique libre est éliminé au préalable par oxydation avec l'iode à pH 10,1. Après destruction de l'excès de l'iode par le bisulfite de sodium, on passe en milieu fortement sulfurique 6 N. L'acide glycuronique libéré des dérivés conjugués donne en présence d'une solution de naphtorésorcinol à 0,4 pour cent, un pigment violet extractible par le toluène.

La coloration a un maximum d'absorption à 565 mμ.

b) - Méthode de DISCHE

Cette méthode est moins spécifique que celle de FISHMAN, car elle dose l'acide glycuronique total (libre et lié).

Une solution contenant de l'acide glycuronique libre ou des glycuronides est chauffée avec de l'acide sulfurique concentré. Le mélange est additionné d'une solution alcoolique de carbazole à 0,1 pour cent. Il apparaît une coloration rose dont l'intensité s'accroît pendant 2 heures et reste stable au moins une heure.

Le maximum d'absorption se situe à 530 mμ.

Résultats expérimentaux

Avec les techniques de SEIBERT et de WOODS, nous avons pu isoler le dérivé conjugué de la Chloroquine, à partir de l'urine des chiens ayant reçu ce médicament par voie parentérale.

Les réactions colorées de FISHMAN et de DISCHE sur l'éluat du dérivé conjugué isolé sont fortement positives, ce qui nous permet d'affirmer que ce dernier est un glycuronide.

D'autre part, le groupe basique libéré du glycuronide par hydrolyse acide ou enzymatique ne réagit pas avec le réactif du ferri-cyanure ferrique, ce qui prouve que l'alcaloïde n'est pas hydroxylé au cours de son passage dans l'organisme. Dans ce cas, la liaison de l'acide glycuronique avec la Chloroquine ne peut se faire vraisemblablement que par un des atomes d'azote de la molécule du toxique.

CHAPITRE DEUXIEME

ETUDE DE LA LIAISON DE LA CHLOROQUINE AVEC LES PROTEINES PLASMATIQUES

L'étude de la liaison des médicaments avec les protéines plasmatiques présente, en pharmacologie, un intérêt toujours croissant.

En effet, la plupart des drogues, à des concentrations thérapeutiques, forment des complexes réversibles avec les protéines du plasma aussi bien qu'avec les protéines dans divers tissus (50). Ces interréactions confèrent aux drogues "liées" des rôles très variés qui ont été particulièrement soulignés par BRODIE (14) :

Lorsque les drogues ont une longue durée d'action, leurs fixations avec les protéines peuvent agir comme des réserves et minimisent les rapides fluctuations du niveau plasmatique.

Certaines drogues fortement liées apparaissent exercer leur effet thérapeutique en déplaçant les hormones de leurs sites protéiques. C'est le cas par exemple des phénylbutazones qui déplacent les corticoides surrénaliens liés avec les protéines, ce qui explique leurs actions antirhumatismales.

Une drogue peut aussi déplacer une autre drogue de son complexe protéique augmentant aussi sa concentration sous une forme libre au niveau des récepteurs.

L'aspect toxicologique de ces liaisons a été évoqué par TRUHAUT (123). Sur le plan de l'analyse toxicologique, il est nécessaire de libérer au préalable, par des moyens physiques ou chimiques, les toxiques de leur complexe protéique avant de les caractériser.

Enfin, la liaison des toxiques avec les protéines peut contribuer à donner aux organes sensibles de l'organisme une protection relative contre les effets nocifs, en raison de la dissimulation des substances qui en sont responsables.

Deux grands groupes de méthodes ont été utilisés pour l'étude des liaisons des médicaments avec les protéines.

1- Ultrafiltration

THORP (121) a trouvé que l'ultrafiltration préconisée par BECHNOLD dès 1907 (8) constitue la meilleure méthode de détermination de la fraction liée du médicament dans un échantillon de plasma. Ce procédé d'étude diffère de la dialyse du fait que la phase aqueuse subit une pression pour passer à travers la membrane semi-perméable et par conséquent, il n'y a pas de dilution du système. Cependant, d'après BRUCK (20), l'ultrafiltration ne permet pas un dosage exact des sulfonamides dans des solutions aqueuses de protéines.

2- Dialyse à travers une membrane semi-perméable

SCHOLTAN a utilisé cette technique pour étudier la liaison de la pénicilline avec les protéines (107). Son appareil comprend deux chambres contenant chacune 1,8 ml de sérum. Ces dernières sont séparées par une membrane de cellophane 600. L'épaisseur de la couche du liquide dans les chambres de dialyse est seulement de 2 mm. Dans ces conditions

cet auteur a observé un état d'équilibre de concentration qui s'établit entre les deux chambres, après un certain temps de dialyse.

CONN et LUCHI (98) appliquant la même technique avec une membrane de cellulose à l'étude de la liaison avec les protéines, sont arrivés à la même conclusion.

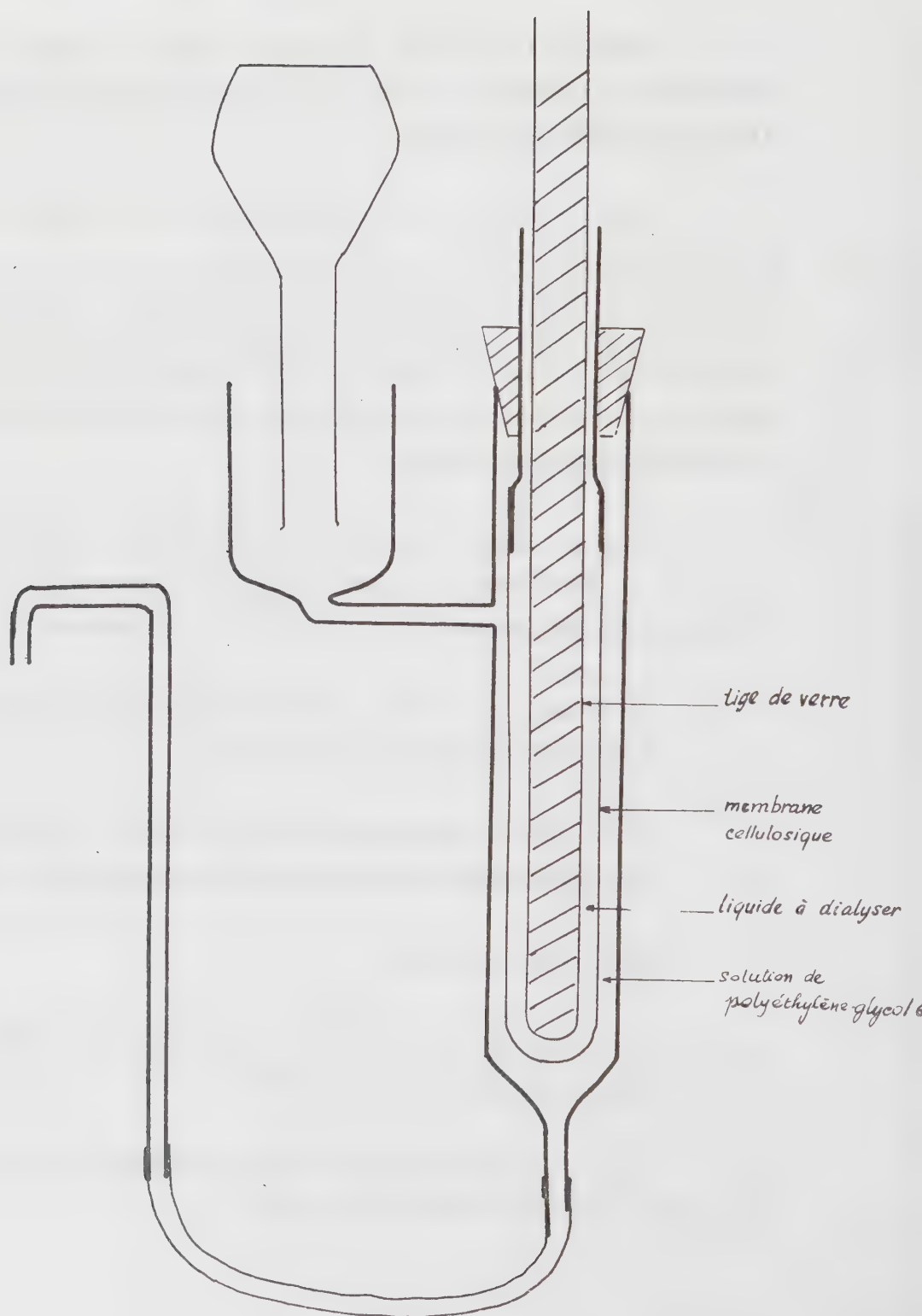
L'existence de cet état d'équilibre dans la dialyse statique se présente comme un effet indésirable dans une étude où l'on veut déterminer exactement la proportion du médicament lié avec les protéines. Il est donc souhaitable d'avoir une méthode qui permettrait d'éviter l'établissement de cet équilibre, et par conséquent de continuer la dialyse jusqu'à ce que tout le médicament libre dans le milieu soit passé à travers la membrane semi-perméable.

Dans cet esprit, nous pensons qu'avec une méthode dynamique la dialyse sur membrane semi-perméable nous permettrait d'atteindre ce but. Aussi, nous avons conçu un appareil comprenant:

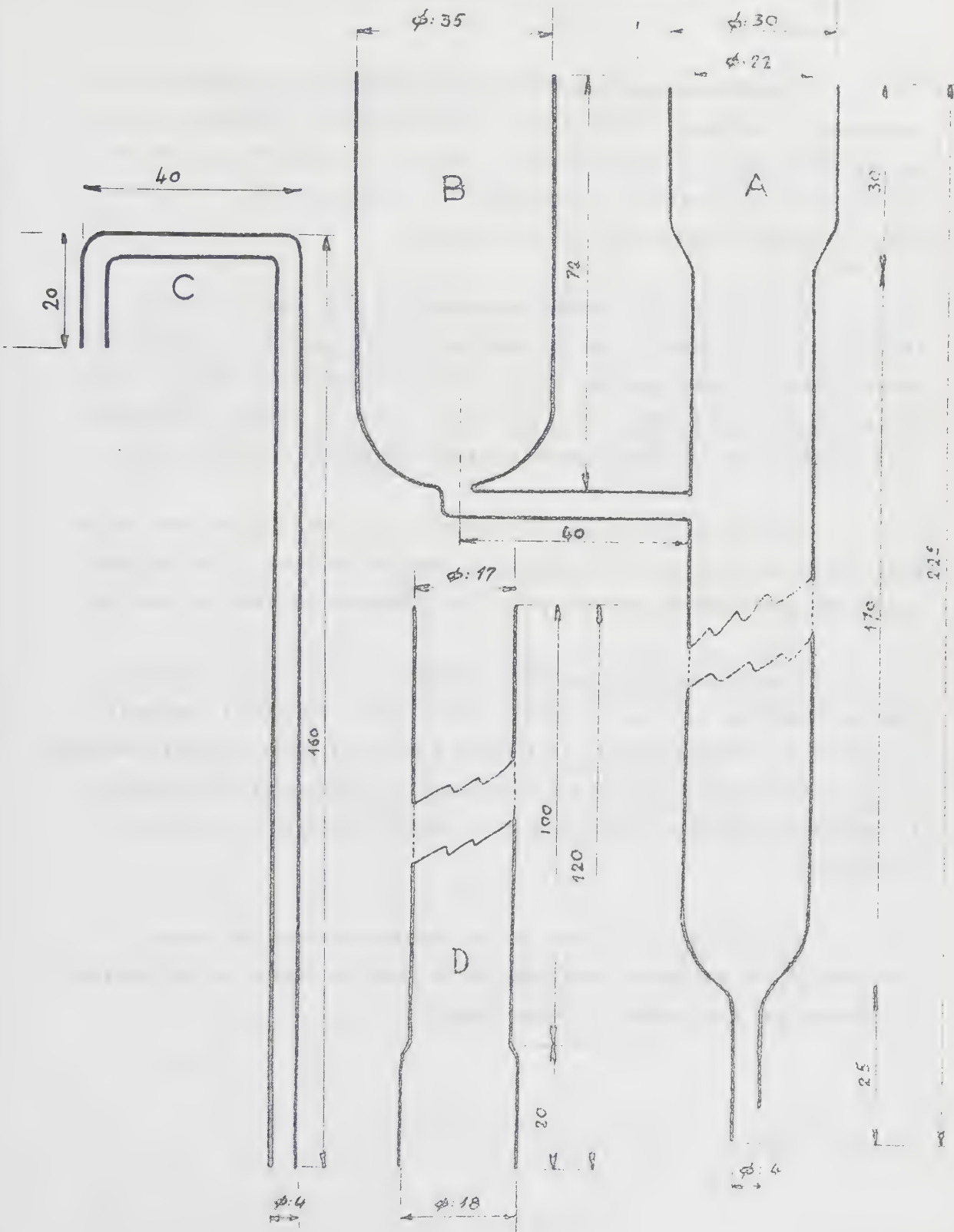
- 1) un tube A en verre, au sein duquel on peut placer une membrane cylindrique en cellulose.
- 2) un tube B communiquant avec le tube A, et dont le diamètre est étudié pour pouvoir recevoir la tubulure d'une fiole jaugée.
- 3) un tube C de sortie
- 4) un tube D auquel on fixe la membrane de dialyse dont la partie terminale est solidement fermée.

Tout ce matériel est en verre. Ses dimensions et son montage sont indiqués dans les schémas respectifs.

SCHEMA DE MONTAGE



SCHEMA de L APPAREIL de DIALYSE



Mode opératoire :

La membrane semi-perméable de cellulose étant remplie avec le liquide à dialyser, c'est-à-dire le plasma mélangé intimement avec une quantité connue de médicament, on ferme à l'aide d'une pince de Mohr le tuyau de sortie en caoutchouc. On remplit le tube A avec le liquide destiné à recevoir le produit dialysé.

Pour assurer une grande autonomie de l'appareil, on peut l'alimenter par le tube B, par le système suivant : une fiole jaugée de grande capacité contenant ce dernier liquide est retournée dans le tube B, la tête étant immergée dans la solution. Ainsi le volume du liquide dans le tube A est toujours constant jusqu'à ce que la fiole soit vide.

La vitesse du liquide, à la sortie, peut être réglée soit par la pince de Mohr, soit par le déplacement vertical du tube C, ce qui provoque une variation de pression entre les différents niveaux du liquide.

Pour augmenter la surface de dialyse, nous avons introduit dans la membrane une tige de verre fermée à ses extrémités, selon la technique de SEEGERS (109). Le liquide à dialyser pourra ainsi se répartir en une couche mince de 3,5 mm d'épaisseur et sur une grande surface de la membrane. En plus, cette tige peut assurer l'agitation au cours de l'opération.

Cet appareil peut être utilisé indifféremment en dialyse statique par la fermeture complète de la pince de Mohr, ou en dialyse dynamique par l'ouverture de cette dernière.

A - ETUDE PAR DIALYSE DYNAMIQUE

1) Préparation du plasma

Nous avons préparé le plasma à partir du sang frais des bovidés recueilli aux abattoirs.

Le sang total, extrait par la veine jugulaire immédiatement après l'abattage de l'animal, est agité vivement avec un mélange d'oxalate d'ammonium, d'oxalate de potassium et de fluorure de sodium pour empêcher la coagulation. Il est ensuite centrifugé à 5.000 tours par minute, pendant un quart d'heure. La couche surnageante constitue un plasma sanguin légèrement jaunâtre, à peine alcalin au tournesol.

2) Dialyse dynamique

10 ml du plasma ainsi préparé sont mélangés avec 1 ml d'une solution chlorhydrique contenant 100 µg de Chloroquine base.

Comme liquide destiné à recevoir le produit dialysé, nous avons utilisé une solution aqueuse de Polyéthylène-glycol 600 (*) à 25 pour mille. (Les essais avec de l'eau distillée n'ont permis qu'un passage très faible, indosable de la Chloroquine libre).

La vitesse du liquide à la sortie est réglée à 45 ml par heure.

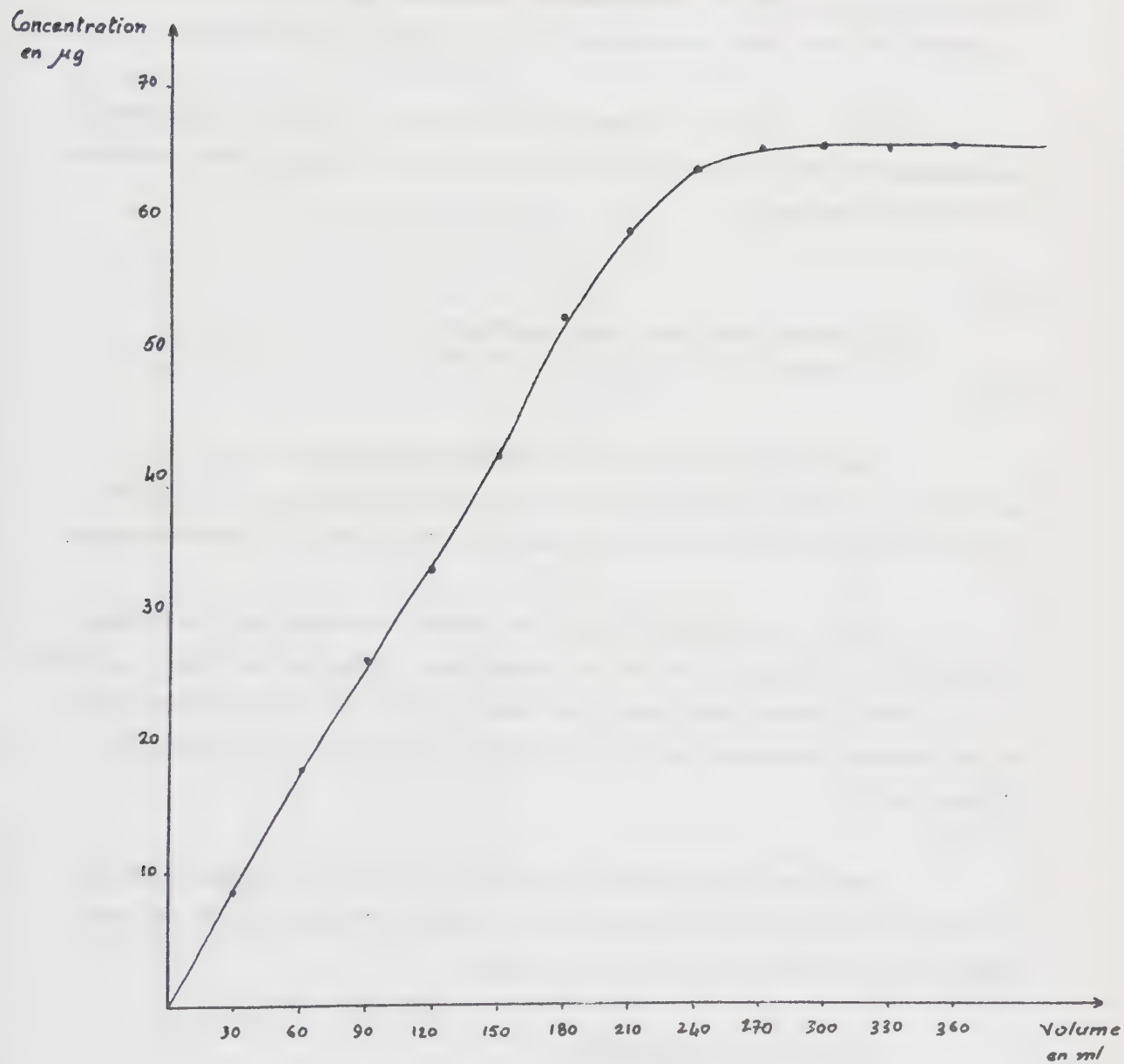
On recueille le liquide par fractions de 30 ml, soit toutes les 40 minutes.

Le dosage de la Chloroquine libre dans chacune de ces fractions est effectué par la méthode spectrophotométrique à 342 mµ.

(*) - Le Polyéthylène-glycol 600 est fourni par GATTEFOSSE.

Résultats expérimentauxTABLEAU X I

Temps en minutes	Volume total recueilli en millilitres	Chloroquine libre ayant passé à tra- vers la membrane entre les 2 fractions successives en µg	Chloroquine libre dialysée en fonc- tion du temps en µg
40	30	8,7	8,7
80	60	9,3	18
120	90	8,8	26,8
160	120	6,3	33,1
200	150	8,9	42
240	180	10,7	52,7
280	210	6	58,7
320	240	5	63,7
360	270	1,3	65
400	300	1	66
440	330	0	66
480	360	0	66
520	390	0	66
560	420	0	66



D'après ces résultats, au bout de 7 heures et 20 minutes (soit 440 minutes), on obtient 66 pour cent de Chloroquine dialysée à travers la membrane de cellulose. Au-delà de ce temps, nous n'avons plus trouvé de l'alcaloïde libre dans les volumes recueillis, ce qui nous permet de penser qu'il ne reste dans la membrane que la forme liée qui représente 34 pour cent de la quantité totale mise en expérience.

Donc, la dialyse dynamique montre que, dans ces conditions expérimentales, 34 pour cent de Chloroquine sont liés avec les protéines plasmatiques bovins.

B - ETUDE PAR DIALYSE STATIQUE

Pour pouvoir comparer les résultats précédents, nous avons procédé à un essai de dialyse par la technique statique où doit s'établir, après un temps plus ou moins long, un état d'équilibre de concentration.

Nous avons travaillé dans les mêmes conditions de concentration qu'avec la dialyse dynamique. Nous avons opéré sur le même appareil dont le tube de sortie est fermé. Le même volume de Polyéthylène-glycol est au contact permanent avec la membrane pendant toute la durée de l'opération.

Pour plus de sécurité, nous avons prolongé la dialyse pendant 24 heures. L'équilibre de concentration devrait s'établir entre les deux faces de la membrane au bout de ce temps.

Résultats expérimentaux :

Après 24 heures, nous avons trouvé un passage de Chloroquine libre représentant 52,7 pour cent de la quantité totale, ce qui donne 47,3 pour cent en forme liée avec les protéines dans la membrane.

CONCLUSION

La dialyse contre une solution de polyéthylène-glycol à 25 pour mille a révélé que 34 pour cent (méthode dynamique) et 47,3 pour cent (méthode statique) de la Chloroquine fixée sur les protéines ne sont pas dialysables.

La dialyse dynamique constitue une méthode intéressante dans l'étude des liaisons des médicaments aux protéines. Non seulement elle présente l'avantage d'être rapide, mais aussi par son caractère dynamique elle provoque constamment une rupture d'équilibre de concentration, ce qui nous permet de déterminer la proportion exacte liée avec les protéines.

CHAPITRE TROISIEME

DEDOUBLEMENT DES ANTIPODES OPTIQUES DE LA CHLOROQUINE

La Chloroquine présente dans sa formule un carbone asymétrique, ce qui lui confère deux antipodes optiques.

La base obtenue par synthèse est racémique.

L'étude du dédoublement des énantiomorphes de la Chloroquine est entreprise par RIEGEL et SHERWOOD (102). Ces auteurs utilisent, comme agent de résolution, l'acide d-bromocamphosulfonique qui est préparé à partir de son sel d'ammonium; d'après la technique de POPE et PEACHEY (97). Cette dernière consiste à chauffer la solution du sel d'ammonium avec un excès de baryte jusqu'à ce que tout l'ammoniac soit éliminé. L'excès de baryte est précipité par passage d'un courant d'anhydride carbonique à travers la solution chaude. Après filtration, l'acide d-bromocamphosulfonique est déplacé de son sel de baryum par l'acide sulfurique. On obtient ainsi une solution d'acide d-bromocamphosulfonique avec quelques traces d'acide sulfurique.

La technique de POPE et PEACHEY est longue et conduit à un produit relativement peu pur. Nous l'avons remplacé par celle utilisant

la résine échangeuse d'ions , d'après le principe de la colonne de SAMUELSON ^(°) .

A - PREPARATION DE L'ACIDE D-BROMOCAMPHOSULFONIQUE à partir de son sel d'ammonium, par la technique de résine échangeuse d'ions

1) Définition d'échange d'ions

L'échange d'ions est une réaction d'échange entre deux phases non miscibles entre certains composés solides - ou plus rarement liquides - et une solution ionique généralement aqueuse. Si l'on appelle M et M' deux ions différents, elle s'écrit :



Elle a pour résultat de remplacer un ion en solution par un autre introduit par un solide qu'on appelle échangeur d'ions . ^(°)

2) Appareillage

La colonne d'échangeur d'ions , d'après SAMUELSON , consiste en un tube cylindrique en verre dont la partie supérieure est évasée en forme d'entonnoir. Le fond de l'appareil, au contraire, est très étiré en une étroite ouverture , qui est reliée, par l'intermédiaire d'un tuyau en

(°) - SAMUELSON (O) - Ion exchange separations in analytical chemistry - John Wiley & Sons ed., New York 1963.

(°) - SAVIDAN (L) - Les résines échangeuses d'ions Dunod ed., Paris 1965.

caoutchouc, à un long tube capillaire de un à deux millimètres de diamètre, au bout duquel est adapté un robinet de fermeture.

L'extrémité de ce tube est placée, de préférence, au-dessus du sommet du lit de résine, afin d'éviter l'entrée de l'air dans ce dernier. Le robinet est ouvert suffisamment pour permettre une vitesse d'écoulement convenable.

3) Technique opératoire

La résine échangeuse d'ions, soigneusement choisie pour son "linkage", c'est-à-dire sa réticulation et pour sa capacité d'échange, en vue d'une fixation efficace de l'ion considéré, repose sur une mince couche de laine de verre non tassée. On doit prendre la précaution de bien laisser gonfler la résine avant son remplissage dans la colonne. Un espace vide suffisant doit toujours être laissé pour l'expansion de la résine selon ses différentes formes ioniques et plus spécialement si elle doit être mise sous forme acide.

En faisant arriver et circuler très lentement au sommet de la colonne une solution de sel d'ammonium de l'acide d-bromocamphosulfonique dans laquelle l'ion NH_4^+ est échangeable contre l'ion H^+ de la résine, l'effluent ne contient que des ions H^+ .

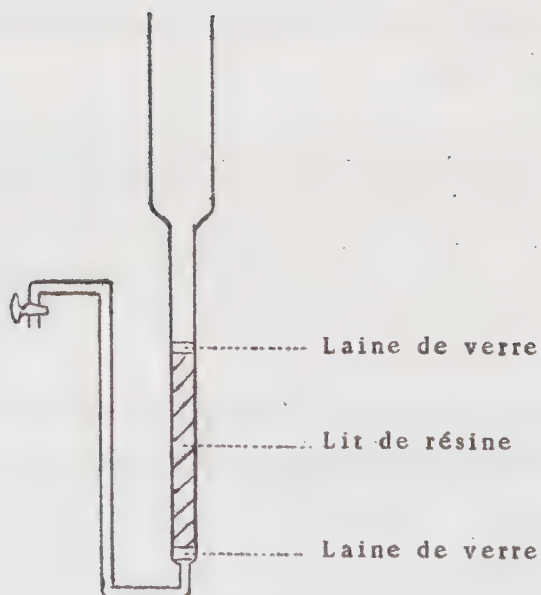
Un remplissage régulier et un système de répartition efficace de la solution sont nécessaires pour éviter la formation de renards ou canaux préférentiels.

Dans notre travail, nous nous sommes servis d'un échangeur de cations fortement acide : " ECHANGEUR D'IONS I MERCK " dont la capacité d'échange est de 4,5 milliéquivalents par gramme. En tenant compte des caractéristiques de cette résine, nous avons utilisé une solution aqueuse à 6,5 pour cent de sel d'ammonium de l'acide d-bromo-

camphosulfonique (*).

Ainsi, nous avons recueilli, à la sortie de la colonne, une solution d'acide d-bromocamphosulfonique qui sera évaporée sous vide à basse température et placée dans un dessiccateur, au-dessus de l'acide sulfurique, d'après la technique de KIPPING et POPE (66), jusqu'à son obtention à l'état sec.

Cet acide ainsi obtenu va nous servir au dédoublement des antipodes optiques de la Chloroquine.



Colonne du type standard
d'après Samuelson

B - DEDOUBLEMENT DES ANTIPODES OPTIQUES DE LA CHLOROQUINE
par l'acide d-bromocamphosulfonique

1) Principe

On combine la Chloroquine base racémique à un acide actif, droit par exemple, à pouvoir rotatif élevé. On obtient alors deux combinaisons qui ne sont pas énantiomorphes et qui diffèrent par conséquent, en général, par toutes leurs propriétés physiques : elles pourront en particulier présenter des solubilités différentes dans certains solvants, ce qui permettra de les séparer facilement par cristallisation fractionnée.

2) Technique opératoire d'après RIEGEL et SHERWOOD

21 grammes de Chloroquine base sont mélangés avec 45 grammes d'acide d-bromocamphosulfonique dans 300 ml d'éthanol absolu à chaud. La solution alcoolique est filtrée, puis laissée cristalliser dans une chambre froide. Les cristaux sont alors séparés rapidement par filtration et sont recristallisés dans 150 ml d'éthanol absolu. On renouvelle la dernière opération jusqu'à ce que le pouvoir rotatoire soit constant :

$$[\alpha]^{27}_D + 62^\circ \quad (0,200 \text{ g dans } 10 \text{ ml d'eau}).$$

La base est obtenue par extraction avec le benzène, en milieu alcalin, d'une solution aqueuse de ce sel. La solution benzénique est filtrée et agitée avec un volume égal d'éther de pétrole. Le mélange de solvants est ensuite concentré et laissé cristalliser à basse température. Les cristaux obtenus ont un point de fusion de 84 à 86° et $[\alpha]^{25}_D + 12.3$ (0,200 g dans 10 ml d'éthanol à 95°C).

(*) - Ce produit nous est fourni par ALDRICH CHEMICAL Co.

La forme gauche du médicament est obtenue par évaporation du liqueur mère. Le résidu est repris par de l'eau distillée qui sera traité comme précédemment. La concentration de la solution organique (benzène et éther de pétrole) est conduite jusqu'à ce que l'on obtienne environ un gramme de cristaux à froid. Ce produit inactif est alors éliminé, et la solution est concentrée de nouveau. Les cristaux obtenus présentent un point de fusion de 84° à 87° et un pouvoir rotatoire $[\alpha]^{27}_D - 13.2$ (0,200 g dans 10 ml d'éthanol à 95°).

Résultats expérimentaux

Nous avons pu, par l'emploi d'un échangeur de cations fortement acide " Echangeur I Merck ", préparer l'acide d-bromocampho-sulfonique à partir de son sel d'ammonium. Cette technique simple et rapide nous a donné des résultats satisfaisants.

Cet acide libre, à l'état sec, est ensuite utilisé comme agent de résolution des énantiomorphes de la Chloroquine, d'après la technique de RIEGEL et SHERWOOD. Nous avons obtenu ainsi, à l'état cristallisé, deux antipodes optiques de cet alcaloïde dont l'un des isomères pourrait présenter des propriétés pharmacologiques plus favorables et des toxicités différentes.

Il serait, dès lors, intéressant, dans un travail ultérieur, de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

Dans les mêmes conditions opératoires que celles de RIEGEL et SHERWOOD, nous avons trouvé des valeurs de pouvoir rotatoire relativement plus faibles : + 10° pour la forme droite et -11.7 pour la forme gauche.

CHAPITRE QUATRIEME

ETUDE DU PASSAGE A TRAVERS LE PLACENTA DE LA CHLOROQUINE ET DE SES DERIVES

La chance que nous avons eue d'expérimenter sur une chienne gravide nous a permis d'aborder le chapitre particulièrement d'actualité du passage des toxiques de la mère au fœtus.

L'étude du passage des médicaments à travers le placenta présente un intérêt particulier lorsque ceux-ci sont susceptibles d'être administrés aux femmes enceintes. En effet, un médicament ou éventuellement ses métabolites peuvent passer à travers le placenta et atteindre le fœtus. Ils pourront ainsi provoquer selon les cas, par leur embryotoxicité, des désordres plus ou moins graves dans le développement de l'embryon.

Dans cet esprit, nous allons étudier le transfert placentaire de la Chloroquine qui se révèle, maintes fois, un véritable toxique.

Pour cette étude, nous avons travaillé sur le foetus de la chienne III qui a reçu une injection sous-cutanée de 15 mg de Chloroquine base par kilogramme de poids corporel, et qui a été sacrifiée 24 heures après l'administration du médicament.

Le foetus, de sexe femelle, pesant 135 g, est bien formé et en étant vraisemblablement au dernier quart de la gestation.

Nous avons analysé séparément chacun de ses organes, et procédé au dosage par la méthode spectrophotométrique directe à 342 mμ. Les résultats se trouvent résumés dans le tableau X.

Avant d'essayer d'interpréter ces résultats, il nous semble nécessaire de rappeler la constitution, le rôle de la barrière placentaire et les différentes théories sur le passage à travers le placenta.

D'après SNOECK (113), le placenta est un organe possédant plusieurs fonctions. Il cumule à la fois les fonctions exercées, chez l'adulte, par les reins, les poumons et l'intestin. Il permet le passage de la circulation maternelle vers la circulation foetale de l'oxygène, des matières nutritives et éventuellement des médicaments ou de leurs produits de transformation. Il assure aussi l'élimination vers la circulation maternelle des produits de déchet du métabolisme foetal.

Ces échanges foeto-maternels se font par l'intermédiaire de la villosité placentaire qui sépare le sang foetal, d'une part, et le sang maternel contenu dans les espaces intervillositaires d'autre part. La mince paroi capillaire foetale et l'épithélium de la villosité constituent la barrière placentaire proprement dite.

TABLEAU X

REPARTITION DE LA CHLOROQUINE DANS LE FOETUSMère :

Poids : 14,500 kg

Dose administrée : 15 mg Chloroquine-base / kg

soit 217,5 mg par injection sous-cutanée

Foetus :

Poids : 135 grammes

sexe : femelle

ORGANES ou LIQUIDE BIOLOGIQUES Poids total en grammes	CHLOROQUINE en µg			Concentration en mg/kg
	Libre	Conjuguée	Totale	
Foetus vidé de ses organes - 97 g	12,2	42,7	54,9	0,56
COEUR 0,88	0	10	10	11,16
REINS 1,29	0	9	9	6,99
CERVEAU 3,10	traces	0	traces	
FOIE 9,81	10	36,5	46,5	4,73
POUMONS 3,38	traces	26,8	26,8	7,90
PLACENTA 120	30,7	46,1	76,8	0,64
LIQUIDE AMNIOTIQUE... 25	215,5	27	242,5	9,70
 B I L A N	Total : 417,6 µg soit 0,19 % de la dose injectée à la mère			

Ce revêtement ectodermique de la villosité ou trophoblaste comprend deux assises différentes : le syncytium externe avec des flots de prolifération, et la couche de Langhans interne formée de grosses cellules disposées en un seul rang. Il se modifie avec l'âge de la gestation.

Dans les premiers mois de formation, la barrière placentaire présente une épaisseur de 0,025 mm qui diminue à 0,002 mm à terme; par suite des altérations de la couche syncytiale et des ruptures de la couche de Langhans. Cette différence des épaisseurs explique le rôle actif du placenta au début de la grossesse, et la fonction passive de cet organe qui devient une membrane filtrante vers les derniers mois de son existence. La perméabilité accrue du placenta vers la fin de la gestation a été confirmée d'ailleurs par FLEXNER et POHL (43) opérant sur le rat avec le sodium radioactif.

A la suite de nombreuses recherches récentes, il semble que le transfert placentaire des médicaments puisse s'effectuer par un ou plusieurs des principaux mécanismes suivants (11, 87, 113):

- 1/ l'ultrafiltration
- 2/ la diffusion simple ou par les molécules transporteuses
- 3/ le transfert actif impliquant une combinaison temporaire des médicaments avec les constituants de la membrane placentaire, par exemple les systèmes enzymatiques.
- 4/ des processus spéciaux comme la pinocytose ou le passage direct à travers les solutions de continuité de la membrane placentaire.

Après ce bref rappel, nous allons voir maintenant quelles conclusions nous pouvons tirer de nos résultats expérimentaux.

1/ La Chloroquine a passé à travers le placenta et se répartit, chez le fœtus, dans les divers tissus, spécialement dans les reins, les poumons, le cœur et le foie.

2/ Il existe une prédominance de la forme conjuguée sur le toxique libre dans tous les organes du fœtus, sauf dans le liquide amniotique. Au niveau du cœur, des reins, et des poumons, on trouve presque uniquement le dérivé conjugué.

Les travaux de BROWN et BURNETT, BROWN et ZUELZER (17, 18) effectués sur les microsomes de foie de cobayes fœtaux et nouveaux-nés ont montré que ceux-ci ont une aptitude virtuelle à former des glycuronides, comparée aux microsomes adultes. Il nous semble donc logique de penser que le dérivé conjugué trouvé chez le fœtus provient de la mère qui a effectué le travail de conjugaison.

Ceci nous amène à formuler quelques suppositions sur le mécanisme du passage transplacentaire du glycuronide de la Chloroquine. Le toxique libre et son glycuronide pourraient être apportés par la circulation maternelle au niveau des lacs sanguins du placenta. La barrière placentaire joue alors le rôle de sélection, retient la forme libre toxique et accorde un passage préférentiel au dérivé glycuroconjugué qui est physiologiquement plus ou moins inactif. L'un des facteurs conditionnant ce passage pourrait être le caractère d'hydrosolubilité des glycuronides: l'acide glycuronique de ce composé conservant sa fonction acide assure une plus grande solubilité dans l'eau de l'aglycone surtout en milieu alcalin (151).

Tout se passe comme si le fœtus, inapte à se défendre à cause de l'immaturité de ses systèmes enzymatiques, bénéficiait de la mère le mécanisme de détoxication générale qui est la glycuroconjugaison.

Une autre observation dans notre étude est à signaler. Malgré la prédominance de la forme libre dans tous les organes du fœtus, la Chloroquine libre existe cependant en quantité notable dans le liquide amniotique. Le rapport entre la forme libre et la forme liée y est de 7,98/1.

Pour interpréter ce fait, la connaissance de l'origine de ce liquide est nécessaire. D'après MERGER (81), il est probable que son origine est mixte : maternelle et foetale. Le liquide amniotique est formé, pour une part, par l'urine du fœtus. La réalité de la sécrétion rénale in utero est établie. La faible quantité de Chloroquine conjuguée dans ce milieu pourrait bien provenir de l'excrétion foetale.

Par contre, l'origine maternelle du liquide amniotique pourrait expliquer la présence de la forme libre qui s'y trouve. Le passage de cette dernière peut se faire lors de la transsudation du liquide à travers les membranes ovulaires. Par ailleurs, l'injection de colorant dans la circulation maternelle aboutit à un passage rapide à travers l'épithélium amniotique (81).

Il est intéressant cependant de savoir par quelle voie s'effectue l'élimination du toxique se trouvant dans le liquide amniotique.

Nous pouvons penser, avec beaucoup de prudence, que la Chloroquine dans ce fluide biologique s'éliminerait au cours de la résorption qui se manifeste par deux processus différents (81) :

1/ la déglutition amniotique par le fœtus. Le liquide est absorbé par l'intestin. Parvenu dans le sang, il traverse la barrière placentaire par les artères ombilicales, emprunte la circulation maternelle, et est éliminé par les reins maternels.

2/ la résorption par l'épithélium amniotique.

En conclusion, la Chloroquine a passé à travers la barrière placentaire et atteint le fœtus, ceci concorde avec les travaux d'ARIAS et coll. (3, 4). Mais son passage se fait presque exclusivement avec la forme conjuguée. De ce fait, il ne semble pas que le fœtus soit exposé directement aux effets toxiques de ce médicament. Les observations rapportées par KJAER (67) sur un cas d'intoxication accidentelle chez

une femme enceinte, par l'ingestion d'une forte dose de Chloroquine, tendent à confirmer cette hypothèse. La guérison est complète en moins de 36 heures et il n'y a aucun effet défavorable sur la suite de la grossesse.

Cependant, il ne faut point rejeter l'hypothèse de la présence d'une glycuronidase dans l'amnios, ce qui mériterait de nouvelles études.

T R O I S I E M E P A R T I E

D I S C U S S I O N

C O N C L U S I O N S

DISCUSSION

Notre étude sur le métabolisme et l'élimination de la Chloroquine est orientée davantage vers un but toxicologique. Nous avons voulu situer notre travail dans le cadre d'une expertise avec la comparaison de diverses méthodes de dosage. Notre attention est surtout portée sur la conjugaison du toxique, qui se présente comme un processus général de détoxication biologique de l'organisme.

Au terme de ces travaux personnels, nous allons confronter nos résultats expérimentaux avec ceux fournis par la littérature sur le métabolisme et la répartition de la Chloroquine dans l'organisme.

Les travaux de BERLINER (10) sur les rats et ceux de WISELOGLE (128) sur les singes vont nous permettre la comparaison. Nous y ajouterons les travaux de PROUTY et KURODA (100) qui déterminent la Chloroquine chez les victimes dans 10 cas de suicide. Tous ces résultats sont rapportés dans un tableau comparatif.

Les méthodes de dosage varient suivant les auteurs. BERLINER a utilisé la méthode de fluorimétrie préconisée par BRODIE (16), tandis que PROUTY et KURODA ont recours à la spectrophotométrie dans l'ultra-violet à 342 m μ . Ces derniers ont appliqué la technique de l'hydrolyse acide à l'autoclave pour libérer la Chloroquine des protéines et des acides nucléiques. Leurs résultats représentent donc l'ensemble de la Chloroquine libre et liée, c'est-à-dire la forme totale. Mais ils n'ont

T A B L E A U C O M P A R A T I F D E S R E S U L T A T S

AUTEUR	WISELOGIE	BERLINER	PROUTY et KURODA	N O S		R E S U L T A T S	
				C O L O R I M E T R I E (M. et P. C H A M B O N)		S P E C T R O P H O T O M E T R I E d'après C H A M B O N	
Méthode de dosage	Colorimétrie (B R O D I E)	FLUORIMÉTRIE	SPECTROPHOTOMÉTRIE				
Dose par 24 heures	25 mg/kg	25 mg/kg	quantité indéterminée (suicide)	30 mg/kg	15 mg/kg	15 mg/kg	
Mode d'administration	non précisé	voie buccale	voie buccale	sous-cutanée	sous-cutanée	sous-cutanée	
Durée de l'expérience	30-31 jours	10 jours	non précisée	20 minutes	22 heures	24 heures	
Expérience sur	SINGE	RAT	HOMME	CHIEN I	CHIEN II	CHIENNE III (gravide)	
CHLOROQUINE	Libre en mg/kg	Libre en mg/kg	Totale en mg/kg Valeur	Totale en mg/kg (Libre et conjuguée)	Totale en mg/kg (Libre et conjuguée)	Totale en mg/kg (Libre et conjuguée)	
			minimum				
PLASMA	3, 62	0, 157		0, 830	0, 177	0, 390	
SANG TOTAL		0, 580		3, 88	3, 24	6, 18	
CERVEAU	48	4, 867	7, 3				
COEUR	265	6, 437	84	21, 20	5, 78	8, 01	
FOIE	776	65, 940	900	5, 65	25, 68	32, 37	
POUMONS	298	100, 48		5, 40	4, 39	9, 00	
RATE	195			18, 60	30, 35	12, 96	
REINS	208	105, 19	470	22, 20	14, 68	6, 66	

TABLEAU COMPARATIF DE NOS RESULTATS

La Chloroquine base a été administrée aux chiens par la voie sous-cutanée

	CHIEN I : 15 kg	CHIENNE II : 14 kg	CHIENNE III GRAVIDE: 14,500 kg
Dose de Chloroquine base par 24 heures	30 mg/kg soit 450 mg	15 mg/kg soit 210 mg	15 mg/kg soit 217,5 mg
Mort	20 MINUTES après injection	22 HEURES après injection	24 HEURES après injection
	CHLOROQUINE en µg		CHLOROQUINE en µg
	Libre	Libre	Libre
	Conjuguée	Conjuguée	Conjuguée
URINE totale	303	9208,5	9480,3
BILE	traces	40	88
SANG	830	traces	traces
CERVEAU (substance grise)	30,6	87,6	130,6
BULBE-CERVELET	30	47	58,7
COEUR (muscle)	2799	431,6	979
FOIE	2425	7565,4	13251
REINS	2820	19,3	526,2
RATE	307,4	4180	579,2
POUMONS	1440	955,7	2021
ESTOMAC	1009	accident	173,2
INTESTIN	634,4	accident	2277
Total : 14,534 mg		Total : 26,909 mg	Total : 39,117 mg
B I L A N		soit 3,20 % de la dose injectée	soit 17,98 % de la dose injectée

pas fait le dosage avant et après l'hydrolyse pour déterminer séparément la forme libre et la forme liée.

WISELOGLE n'a pas donné de détails sur sa méthode qui est celle de BRODIE modifiée.

Bien que les résultats soient différents dans ces expériences , nous pouvons cependant dégager des remarques suivantes :

1°/ Quelle que soit l'espèce de l'animal utilisé, la Chloroquine se fixe en quantité notable dans le cerveau, le coeur, le foie, les poumons, les reins et la rate.

2°/ La différence observée entre ces valeurs serait due à la différence de l'espèce et à la diversité des méthodes de dosage. Par ailleurs les expériences de BERLINER et de WISELOGLE durent respectivement 10 et 30 jours, ce qui provoquerait le phénomène d'accumulation du médicament. La durée de nos expérimentations sur les chiens ne dépasse pas 24 heures.

3°/ Dans nos expériences, nous avons retrouvé, uniquement dans les parties viscérales, les quantités suivantes de Chloroquine exprimées en pourcentage de la dose injectée : 3,20% (Chien I; intoxication suraiguë avec 20 minutes de survie), 12,81% (Chien II: intoxication aiguë interrompue au bout de 22 heures) et 17,98% (Chien III: intoxication aiguë interrompue au bout de 24 heures).

Ces déficits dans notre bilan pourraient s'expliquer par une fixation importante du toxique dans la musculature de la carcasse que nous n'avons pas envisagé d'analyser au cours de nos expériences. D'ailleurs , cette hypothèse est en accord avec l'importante surcharge du toxique dans les muscles cardiaques que nous avons observée dans tous les cas : 21,20 mg par kilogramme de poids d'organe (Chien I), 5,78 mg/kg (Chien II) et 8,01 mg/kg (Chien III).

D'autre part, chez le Chien I dont la mort est survenue 20 minutes après l'introduction de Chloroquine, une quantité très notable du toxique (40 mg) a été retrouvée sous la peau, sur une faible surface de 100 cm^2 environ, à l'endroit de l'injection. Ceci nous permet de penser que la diffusion du médicament, à partir du milieu de stockage primitif, est incomplète. Par conséquent, une grande partie de Chloroquine pourrait encore se trouver dans le tissu conjonctif lâche sous-cutané, aux environs du point d'injection.

4°/ Il est à noter que chez le Chien II dans nos expériences, nous avons observé une rétention anormalement élevée du toxique au niveau de la rate fortement hypertrophiée par une parasitose vermiculaire. Il s'agirait vraisemblablement d'un tropisme parasitaire très accusé de la Chloroquine.

5°/ Quant à l'élimination de la Chloroquine, 24 heures après l'administration d'une dose de 15 mg de base/kg, par voie sous-cutanée, nous avons trouvé une excrétion urinaire et fécale correspondant respectivement à 5,75 % et 1 % environ.

Cette élimination se fait très tôt, car dans l'expérimentation sur le Chien I, 20 minutes après l'injection, l'urine totale contient déjà 443 µg de Chloroquine.

BERLINER, dans des expériences prolongées sur plusieurs jours, a observé une excrétion urinaire de 14 % et une excrétion fécale de 8 % de la dose de Chloroquine administrée.

Cette faible excrétion par la voie fécale nous incite à penser au phénomène de réabsorption intestinale. Dans une expérimentation particulière comportant des dosages dans les différentes parties de l'intestin, nous avons pu situer ce processus dans l'intestin grêle, plus spécialement au niveau du duodénum.

En toxicologie, la méthode classique de STAS-OTTO-OGIER présente un intérêt certain dans les expertises où l'on ignore totalement la nature du toxique responsable. Nous avons vu, dans une étude comparative, qu'elle se révèle insuffisante, car elle ne tient pas compte de la forme conjuguée du toxique. Ainsi, dans les liquides résiduels déjà épuisés selon cette méthode, nous avons trouvé, après hydrolyse acide à l'autoclave, 295 μ g de Chloroquine base correspondant à la forme conjuguée.

La méthode de M. et P. CHAMBON, adaptée de celle de WOODS, a pu compléter cette lacune par sa technique d'hydrolyse en milieu fortement acide à l'autoclave. Elle est valable pour tous les alcaloïdes présentant une stabilité suffisante au traitement, ce qui devra pour chaque type d'alcaloïde étudié être préalablement expérimenté.

Nous avons pu, par la méthode de M. et P. CHAMBON, retrouver la Chloroquine tant sous la forme libre que sous la forme conjuguée dans tous les organes. La Chloroquine se comporte comme un alcaloïde stable qui peut subir le chauffage en milieu acide à 120° C sans altération de la molécule. Signalons que cette méthode a conduit au succès de nombreuses études sur la glycuconjugaison de la Morphine, l'Hydromorphone, la Dihydrone, le Dextrophan, la Nalorphine qui sont des travaux du Laboratoire de Chimie Organique et Toxicologie de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de LYON.

A notre connaissance, aucun auteur n'a étudié la répartition de la forme conjuguée de la Chloroquine dans l'organisme. Pourtant, ces dérivés conjugués revêtent un rôle des plus importants dans l'élimination des toxiques. Nos résultats obtenus ont montré que, parmi les viscères étudiés, c'est au niveau du bloc bulbe-cervelet et des reins que se trouvent les pourcentages les plus élevés de la forme conjuguée par rapport à la forme libre :

- dans le bloc bulbe-cervelet: 286 % (Chien I: 20 minutes de survie)
158 % (Chien III: 24 heures de survie)
- dans les reins : 227 % (Chien II: 22 heures de survie)
140 % (Chien III: 24 heures de survie)

La glycuconjugaison semble cependant être favorisée par la fonction phénol libre dans la molécule des alcaloïdes. H. CRETIN (33), travaillant sur le chien avec une dose de 2,05 mg par kilogramme de poids, d'hydromorphone a trouvé ces résultats après 16 heures d'injection sous-cutanée.

	Résultats de H. CRETIN		Nos résultats			
Dose	2,05 mg/kg		15 mg/kg			
Chien	mort 16 heures après injection		mort 24 heures après injection		mort 22 heures après injection	
Produit utilisé	HYDROMORPHONE en µg (fonction phénol)		CHLOROQUINE en µg (pas de fonction phénol)			
	Libre	Conjuguée	Libre	Conjuguée	Libre	Conjuguée
BILE	0	348	88	88	40	20
URINE	1060	12355	9480	3025	9208	315
SANG	0	144	0	390	0	173
FOIE	203	95	13251	2354	7565	1164
REINS	86	48	526	736	19	433
ESTOMAC	126	504	173	132		
INTESTIN	232	587	2277	2218		

D'après ce tableau, nous pouvons remarquer que l'hydromorphone et la Chloroquine n'ont pas le même métabolisme. Dans la bile et l'urine, malgré la faible dose utilisée, l'Hydromorphone existe en quantité très importante, avec une forte prédominance de la forme conjuguée. La Chloroquine, au contraire, administrée avec une dose 7 fois plus grande, présente dans ces mêmes liquides biologiques des concentrations nettement inférieures. Dans ce dernier cas, c'est la forme libre qui est prédominante.

La différence entre ces résultats serait due non seulement à la structure des molécules, mais surtout à la fonction phénol libre de l'Hydromorphone qui pourra établir facilement des liaisons avec l'acide glycuronique de l'organisme.

La Chloroquine, étant dépourvue de cette fonction, ne peut se combiner avec l'acide glycuronique que par un de ses atomes d'azote dans la molécule. L'existence de ce genre de N-glycuronide a été confirmée par DUTTON (38). Par ailleurs, la fragilité de la liaison des N-glycuronides expliquerait la relative pauvreté de la Chloroquine conjuguée dans nos expériences. Cependant, il ne faut point rejeter l'hypothèse de la présence d'une glycuronidase dans les milieux biologiques qui peut éventuellement scinder le composé glycuronique.

Par les techniques de SEIBERT et de WOODS, nous avons pu isoler le glycuronide de la Chloroquine que nous avons hydrolysé ensuite à l'autoclave et en milieu fortement acide, ou par l'action de la β -glycuronidase. Le groupement basique libéré et identifié par son R_f , comme la Chloroquine, ne réagit pas avec le réactif au ferricyanure ferrique, ce qui prouve que ce médicament n'est pas hydroxylé au cours de son passage à travers l'organisme.

Dans une expertise toxicologique, lorsque la nature du toxique responsable est identifiée, le choix d'une méthode de dosage précis, sensible et sélectif s'impose. Nos expériences ont démontré que la méthode

de M. et P. CHAMBON est parfaitement valable dans la détermination de la Chloroquine. Par la formation d'un complexe entre l'alcalofde et le méthyl-orange, elle contribue à l'isolement du toxique, extrait des milieux biologiques très variés, à un haut degré de pureté.

L'étude de la liaison des médicaments avec les protéines présente un intérêt toujours croissant, par ses nombreuses possibilités. Nous avons contribué à cette étude par une méthode de dialyse dynamique sur membrane semi-perméable de cellulose qui offre des avantages sur la dialyse statique classique : l'établissement de l'état d'équilibre des concentrations est évité, et les opérations sont plus rapides. Nous avons travaillé avec la dialyse dynamique, et avons obtenu au bout de 7 heures 20 minutes, un passage de 66 pour cent de Chloroquine libre, tandis que dans les mêmes conditions, la dialyse statique, au bout de 24 heures, donne un résultat de 52,7 pour cent. BERLINER, travaillant sur le sang humain citraté à un pH 7,35 et à 38° C par la dialyse avec une membrane de cellophane (10), a trouvé 55 pour cent de Chloroquine liée aux protéines. Mais il n'a pas précisé davantage les conditions opératoires.

La Chloroquine, médicament de synthèse, est obtenue sous la forme racémique. Chez l'homme, le produit d'élimination de cet alcalofde présente un pouvoir rotatoire positif (127). Ceci permet de penser que l'un des isomères optiques est dégradé préférentiellement dans l'organisme. Il serait intéressant dans un travail ultérieur d'étudier l'activité et la toxicité de ces antipodes optiques qui pourraient avoir des comportements différents en pharmacologie.

Nous avons étudié le dédoublement des isomères de la Chloroquine selon la technique de RIEGEL et SHERWOOD (102). Ces auteurs ont utilisé comme agent de résolution, l'acide d-bromocamphosulfonique à partir de son sel d'ammonium. Dans la technique originale, ce dernier, traité par la méthode de POPE et PEACHEY, est transformé en sel de baryum, qui sous l'action de l'acide sulfurique donne l'acide correspondant.

Cette méthode comporte des opérations très longues et conduit à un produit mélangé avec quelques traces d'acide sulfurique. Le passage d'une solution aqueuse du sel d'ammonium à travers la colonne de résine échangeuse de cations I MERCK nous a permis d'obtenir directement l'acide d-bromocamphosulfonique d'une manière simple et rapide.

Notre étude sur le transfert placentaire chez la chienne a montré que la Chloroquine a réellement passé à travers la barrière du placenta, mais presque uniquement sous la forme conjuguée. Ceci n'est peut-être pas généralisable.

En effet, les différentes modalités de transfert sont liées à la structure histologique du placenta de chaque espèce. Nous reproduisons ici le tableau de la constitution des placentas chez les mammifères (35), que ROBERTS a défini avec soins (103). Les travaux de NICOL et coll. (90) ont en effet montré que le transfert de l'immunité se fait différemment suivant les groupes d'espèces des mammifères, soit par voie transplacentaire, soit par voie mammaire, ou par les deux voies ensemble. Il s'agit ici, en fait, des grosses molécules d'anticorps protéiniques.

Chez la jument, la vache, la chèvre et la truie qui ont un placenta du type épithélio-chorial, la transmission des anticorps se fait presque exclusivement par la voie mammaire. Dans ce cas, l'imperméabilité du placenta serait due au grand nombre de couches séparant les deux circulations foetale et maternelle. En allant des membranes foetales vers l'utérus, on rencontre successivement : l'endothélium chorial, le conjonctif chorial, l'épithélium chorial, la lumière utérine, l'épithélium utérin, le conjonctif utérin et l'endothélium capillaire maternel.

CONSTITUTION et PERMEABILITE PLACENTAIRES

CHEZ LES MAMMIFERES

ESPECE ANIMALE		Jument, vache Anesse, Truie Chèvre.	Brebis	Chienne Chatte	Femme Singes Rongeurs
PLACENTA		Epithélio-chorial	Syndesmo-chorial	Endothélio-chorial	Hémo-chorial
TUS	Endothélium vasculaire	+	+	+	+
	Tissu conjonctif	+	+	+	+
	Epithélium chorial	+	+	+	+
Lumière utérine		+	-	-	-
RE	Epithélium utérin	+	-	-	-
	Tissu conjonctif	+	+	-	-
	Endothélium vasculaire	+	+	+	-
Immunité		Colostrale	Colostrale surtout	Colostrale et Transplacentaire	Transplacentaire

DERIVAUX (J)

Obstétrique vétérinaire

Vigot Frères édit. Paris 1957

Schéma des perméabilités placentaires et mammaires
aux anticorps selon les espèces de mammifères.

GROUPES	Perméabilité mammaire	Perméabilité placentaire	Espèces du groupe
Placenta à structure épithélio-choriale 7 couches	+ + + + +	- - - - +	Jument Vache Chèvre Truie
Placenta à structure syndesmo-choriale 5 couches	+ + + + -	- - - - +	Brebis
Placenta à structure endothélio-choriale	+ + - - -	- - + + +	Chienne Chatte Louve Chacal
Placenta à structure hémo-choriale	- - - - +	+ + + + +	Femme Femelles des primates et des rongeurs: lapine, cobaye, souris, ratte

D'après NICOL (L) et coll.

Etude comparée de la transmission de l'immunité des mères
aux nouveaux-nés.

Rev. Immunol. 1960, 24, 16-23.

Dans les placentas du type syndesmo-chorial, représenté par les Ovidés, l'épithélium utérin a disparu et l'épithélium chorial se trouve directement soudé au conjonctif utérin. La lumière utérine a disparue. Cette réduction du nombre de couches permet une plus grande perméabilité placentaire. Mais la principale voie du transfert des anticorps reste encore la voie mammaire.

Chez la chienne et la chatte dont le placenta est du type endothélio-chorial, les constituants du chorion foetal restent intacts, tandis que persiste simplement l'endothélium capillaire maternel, ce qui permet un passage plus grand encore par la voie placentaire. Chez ces espèces, le transfert de l'immunité se fait donc à la fois par la voie mammaire et par la voie transplacentaire, avec une faible prépondérance de cette dernière.

Ce n'est que chez la femme et les femelles des primates, les cobayes, les souris où l'on observe un transfert presque uniquement par la voie placentaire. Dans ce groupe, le placenta est du type hémochorial, le sang maternel est au contact direct avec le chorion foetal. Ce genre de placentation favorise au maximum le passage des anticorps à travers le placenta.

Ainsi, la perméabilité placentaire, pour une substance donnée, est très variable selon les groupes d'espèces des mammifères. Même dans chaque groupe, on doit tenir compte aussi de la notion d'individualité de chaque espèce. Mais, étant donné la plus proche constitution histologique des placentas de la femme et de la chienne, nous pensons pouvoir envisager, mais avec beaucoup de prudence, l'extrapolation de nos résultats obtenus sur la chienne à la femme.

Le passage de la Chloroquine à travers le placenta a été confirmé par ARIAS et coll. (3, 4), mais la nature du produit passé n'est pas précisée. Nous avons trouvé, dans tous les organes du foetus, sauf le liquide amniotique, une prédominance de la forme conjuguée. Bien que cette dernière

soit vraisemblablement physiologiquement peu active, il y a cependant à craindre l'action hydrolysante de la β -glycuronidase qui pourrait exister dans les tissus du fœtus. Sous l'action de cet enzyme, le groupement basique du toxique sera libéré et exercera sa toxicité sur les organes fragiles du fœtus.

Mais, si le fœtus est dépourvu de la β -glycuronidase, le dérivé conjugué pourrait être la forme de protection du fœtus contre une invasion massive du toxique libre. Ceci ne vient pas en opposition avec les observations de KJAER (67) qui rapportent un cas d'intoxication accidentelle par la Chloroquine chez une femme enceinte. Cette dernière est guérie sans présenter de suites défavorables sur la grossesse. Par ailleurs, les rapports de l'Organisation Mondiale de la Santé ne révèlent aucun effet néfaste de la Chloroquine, sur la grossesse, la parturition ou la santé des nouveaux-nés.

De ces observations, il nous semble permis de penser que chez l'homme, le fœtus soit bien protégé contre l'action toxique de la Chloroquine, vraisemblablement par le même mécanisme que nous avons observé dans le fœtus de la chienne, c'est-à-dire que la barrière placentaire ne laisse passer préférentiellement que la forme conjuguée hydro-soluble et peu active.

Le transfert placentaire ne dépend pas uniquement de la constitution du placenta, mais aussi de l'âge de la grossesse. Vers la fin de la grossesse, des modifications importantes interviennent dans la structure de cet organe. Des dépôts de fibrine, des infarctus et d'autres phénomènes de dégénérescence diminuent la perméabilité placentaire, tandis que des ruptures vasculaires de plus ou moins grande importance peuvent créer des communications artificielles entre la circulation de la mère et celle du fœtus (164).

Dans notre expérimentation, le fœtus bien formé mesurant 13 centimètres serait vraisemblablement au dernier quart de la gestation. Nos résultats qui ont montré la possibilité du placenta de transmettre la Chloroquine au fœtus, sont, bien entendu, valables seulement pour ce stade de gestation.

Nous avons vu que les anticorps qui sont des composés protéiniques à poids moléculaire très élevé, habituellement de 150.000 et plus, ont la possibilité de passer à travers le placenta. Il n'est pas illogique de penser que les médicaments liés aux protéines plasmatiques pourraient atteindre le fœtus par le même mécanisme. Il est souhaitable que cette hypothèse servira de base de départ pour un travail de plus grande ampleur.

CONCLUSIONS

La Chloroquine, antimalarien de synthèse au pouvoir schizonticide puissant, mais également largement utilisé dans les maladies du collagène, fut la cause de nombreuses intoxications graves. Des effets secondaires toxiques en cours de traitement peuvent conduire à l'interruption de celui-ci.

Il nous a paru, dès lors, intéressant d'étudier les méthodes de détection et de dosage du médicament lui-même et éventuellement de ses métabolites à travers l'organisme.

Nous avons procédé, chez le chien, à l'injection par voie sous-cutanée de Chloroquine base dissoute en milieu chlorhydrique, réalisant des intoxications suraiguës et aiguës, ces dernières interrompues à étapes déterminées.

Nous avons pu, dans les mêmes directives, intervenir sur une chienne gravide et suivre les métabolites chez la mère et chez le fœtus.

1) La détection et le dosage de la Chloroquine libre dans les différents liquides et viscères ont pu être réalisés après séparation des matières protéiques, selon la méthode de M. et P. CHAMBON, ou après application de la méthode de STAS-OTTO. La méthode spectrophotométrique, la méthode de complexation au méthyl-orange selon BRODIE et M. et P. CHAMBON nous ont donné des résultats satisfaisants.

2) La recherche des métabolites conjugués fut effectuée selon la méthode de M. et P. CHAMBON, après hydrolyse chlorhydrique à 120°. Elle révéla des quantités parfois élevées de Chloroquine conjuguée. Cette dernière hydrosoluble, mais insoluble dans l'éther et le chloroforme, se retrouve du reste dans les liqueurs aqueuses résiduelles déjà épuisées de la méthode de STAS-OTTO.

La chromatographie sur papier permet d'identifier à la Chloroquine initiale non hydroxylée, l'alcaloïde résultant de l'hydrolyse acide.

3) La nature de la Chloroquine conjuguée fut définie à la suite de son isolement chromatographique sur colonne de cellulose selon SEIBERT, puis purification sur papier et hydrolyse acide. On put identifier, par les réactions colorées de DISCHE et FISHMAN, le copule acide glycuronique. La preuve complémentaire fut apportée par l'hydrolyse enzymatique réalisée par la β -glycuronidase qui permet d'affirmer l'identité d'un acide Chloroquine glycuronique, vraisemblablement N-glycuronide.

4) L'étude du moyen de circulation de la Chloroquine base insoluble dans l'eau, à travers l'organisme, nous a conduit à définir son éventuelle liaison aux protéines. Nous avons suivi la dialyse d'une solution de Chloroquine dans le plasma des bovidés dans un appareil original, selon une méthode dynamique et une méthode statique. La dialyse contre l'eau est insignifiante. La dialyse contre une solution aqueuse de polyéthylène-glycol 600 à 25 pour mille a révélé que 34 % (méthode dynamique) et 47,3 % (méthode statique) de la Chloroquine fixée sur les protéines ne sont pas dialysables.

5) Une intoxication suraiguë est provoquée chez le Chien I par injection sous-cutanée de 30 mg/kg de Chloroquine base entraînant la mort en 20 minutes.

Des intoxications aiguës sont obtenues par injection sous-cutanée de Chloroquine à la dose de 15 mg/kg :

- La Chienne II est sacrifiée après 22 heures.

- La Chienne III , au dernier quart de sa gestation (7è-8è semaine) est sacrifiée après 24 heures.

6) Les dosages de la Chloroquine libre et son glycuconjugué ont été effectués sur la quasi-totalité de l'urine vésicale et extériorisée, du sang, des viscères et de l'encéphale, mais non sur la carcasse.

Les quantités totales retrouvées, dans ces conditions, exprimées en pourcentage de la dose injectée croissent avec le temps de survie.
3,20 % : 20 minutes de survie (Chien I) , 12,8 % : survie 22 heures (Chien II) , 17,9 % : survie 24 heures (Chien III).

Le muscle cardiaque se révèle chez le Chien I, mort en 20 minutes, l'un des organes retenant le plus de Chloroquine, à l'état libre, mais également conjugué dans le rapport 2800/850. Ceci laisse penser à une fixation initiale importante sur les protéines musculaires et probablement en est-il de même sur la carcasse. Mais cette fixation cardiaque massive initiale paraît rendre compte des symptômes cardio-vasculaires au cours de l'intoxication aiguë.

7) Dans l'intoxication suraiguë avec décès rapide (Chien I), l'élimination urinaire, bien que faible, entraîne à la fois forme libre et conjuguée dans le rapport 303/140, alors que la bile ne contient que des traces d'alcaloïde. Le tube digestif cependant, estomac et intestin, contient une quantité notable des formes libres et, bien que plus minime, des formes conjuguées.

Des concentrations élevées de forme libre sont trouvées dans le sang, plus encore dans le foie et dans le rein, mais à peu près exemptes de glycuconjugué.

Par contre, des organes très vascularisés, poumons et rate, et plus particulièrement cette dernière, manifestent une aptitude marquée à la conjugaison.

On doit également signaler une nette prépondérance de la forme conjuguée (86 μ g) sur la forme libre (30 μ g) au niveau du bloc bulbe-cervelet.

8) Dans les intoxications interrompues après 22 à 24 heures, on constate la présence de forme conjuguée dans tous les prélèvements, et même exclusive dans le sang.

L'urine élimine près de 1/3 de la quantité d'alcaloïde retrouvée avec environ 3 fois plus de forme libre que de forme conjuguée.

L'intestin contient à égalité forme libre et conjuguée et le tout correspond à environ 12 % de la quantité totale retrouvée.

Les reins gardent des quantités variables d'alcaloïde, pas très élevées, avec prédominance des conjugués.

Le muscle cardiaque retient encore une quantité notable de forme libre et aussi conjuguée, mais sensiblement moins élevée que dans la cas à courte survie.

Les rétentions les plus considérables se font au niveau des poumons, mais surtout dans le foie qui atteint pour le Chien III 40 % de la quantité retrouvée dont près de 1/5 à l'état conjugué. La bile ne contient, ici encore, que des quantités assez réduites, mais équivalentes en forme libre et conjuguée.

L'encéphale révèle aussi un léger enrichissement avec équilibre des formes libre et conjuguée.

9) La concentration exceptionnellement élevée en formes libre et conjuguée de la rate du Chien II paraît trouver une explication dans la parasitose vermiculaire kystique hypertrophiant l'organe et qui témoignerait ainsi d'un tropisme parasitaire très accusé de la Chloroquine.

10) Le foetus libéré après le sacrifice de la mère (Chienne III) et soumis au protocole analytique précédent a permis les constatations suivantes qui traduisent un rapide passage de l'alcaloïde de la mère au foetus.

Le liquide amniotique a une concentration en alcaloïdes totaux (9,7 mg/kg), peu éloignée de celle de l'urine maternelle (11,7 mg/kg) avec une très large prédominance de la forme libre (215 µg) par rapport à la forme conjuguée (27 µg) que l'on pourrait interpréter comme la conséquence de la dialyse du sang maternel initialement très riche en forme libre.

Les formes conjuguées prédominent dans tous les autres organes à peu près exclusives dans le coeur, les reins, les poumons qui ont les plus fortes concentrations par kilogramme d'organe. Quant au foie, où domine la forme conjuguée (36,5 µg) sur la forme libre (10 µg), sa concentration totale est une des plus faibles parmi les viscères.

Le placenta, de même que la carcasse, ont des concentrations faibles, 0,64 à 0,56 mg/kg avec à la fois Chloroquine libre et glycuconjuguée, mais prédominance de cette dernière.

Le cerveau du foetus ne permet de déceler que des traces de la seule forme libre.

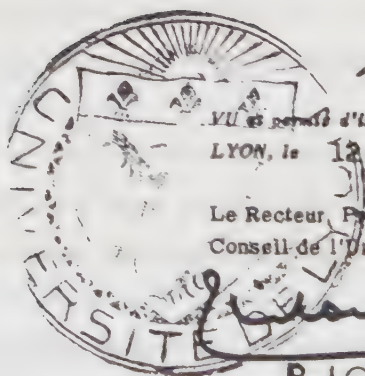
Cette répartition à travers l'ensemble foetal de la Chloroquine apportée par le sang maternel semble traduire d'une part, une sélection qui laisse dans le liquide amniotique la majeure partie de la forme libre,

et fort peu de conjugué, tandis que d'autre part, certains viscères, tel le foie, n'ont encore qu'un tropisme assez faible dû probablement à leur immaturité. Néanmoins, la prédominance des formes conjuguées dans les viscères (cœur, rein, foie, poumon : forme conjuguée = 82 μ g, forme libre = 10 μ g) laisse penser à une certaine aptitude à la glycuconjugaison déjà à cette phase de la gestation, et enfin démontre encore l'importance de la recherche des alcaloïdes conjugués, au cours d'une expertise toxicologique médico-légale du fœtus, et aussi l'intérêt des analyses du liquide amniotique correspondant.

Le Président de la Thèse : Prof. M. CHAMB

VU, le Doyen :

Chambaud



VU et permis d'imprimer

LYON, le 12 février 1966

Le Recteur, Président du
Conseil de l'Université,

P. Louis
P. LOUIS

B I B L I O G R A P H I E

1. ALVING (A.S.), EICHELBERGER (L.), CRAIGE (B.Jr), JONES (R.jr), WHORTON (C.M.) and PULLMAN (T.N.):

Studies on the chronic toxicity of Chloroquine.
J. clin. Invest., 1948, 27, (P.2), 60-65.

2. ANDERSAG (H.), BREITNER (S.) and JUNG (H.):

Basic substituted quinoline derivatives,
German patent 683.692 (Oct. 26, 1939)
U.S. Patent 2,233.970 (March 4, 1941)

3. ARIAS (I.M.), GARTNER (L.), FURMAN (M.), and WOLFSON (S.):

Studies of the effect of several drugs on hepatic glucu-
ronide formation in newborn rats and humans.
Ann. NY Acad.Sci.1963, 111, 274-280.

4. ARIAS (I.M.), GARTNER (L.), FURMAN (M.) and WOLFSON (S.):

Effects of several drugs and chemicals on hepatic
formation in newborn rats.
Proc. Soc. exp.Biol.(N.Y.)1963, 112, 1037-1040.

5. ARORA (R.B.), SHARMA (V.N.) and MADAN (B.R.):

Antiarrhythmics Part I - Chloroquine in auricular
fibrillation.
Indian J.med.Res., 1955, 43, 659-666.

6. AUBERTIN (E.):

Les antipaludéens de synthèse dans le traitement de l'asthme.

J. Med. Bordeaux, 1962, 139, 1095.

7. BACQ (Z.M.), CHEYMOL (J.), DALLEMAGNE (M.J.), HAZARD (R.), LA BARRE (J.), REUSE (J.J.) and WELSCH (M.):

Pharmacodynamie biochimique.

Masson éd., Paris 1961.

8. BECHHOLD (H.):

Ultrafiltration.

Biochem. Z., 1907, 6, 379-408.

9. BELLEVAUX (J.N.) et VANDERICK (F.):

Suicide par la Chloroquine.

Ann. Soc. belge Méd. trop., 1958, 38, 553-555.

10. BERLINER (R.W.), EARLE (D.P.), TAGGART (J.V.), ZUBROD (C.G.), WELCH (W.J.), CONAN (N.J.), BAUMAN (E.), SCUDDER (S.T.) and SHANNON (J.A.):

Studies on the chemotherapy of the human malaras.

VI- The physiological disposition, antimalarial activity, and toxicity of several derivatives of 4-amino quinoline.

J. Clin. Invest., 1948, 27(P.2), 98-107.

11. BINNS (T.B.):

Absorption and Distribution of drugs.

Livingston éd., Edinburgh and London 1964.

12. BOURRELIER (J.), et LE BRETON (R.):

Suicide par la Nivaquine.

Ann. Méd. lég., 1955, 35, 221-222.

13. BOX (E.D.), BOX (Q.T.) and YOUNG (M.D.):

Chloroquine resistant plasmodium falciparum from
Porto Velho, Brazil.
Amer. J. trop. Med. Hyg., 1963, 12, 303-304.

14. BRODIE (B.B.):

Vè Symposium Ouest-européen de Chimie clinique, Paris
12-13 Avril 1965.

15. BRODIE (B.B.) and UDENFRIEND (S.):

The estimation of basic organic compounds and a tech-
nique for the appraisal of specificity. Application to
the cinchona alkaloids.
J. Biol. Chem., 1945, 158, 705-714.

16. BRODIE (B.B.), UDENFIELD (S.), DILL (W.) and CHENKIN (T.):

Estimation by conversion to fluorescent compound.
J. Biol. Chem., 1947, 168, 319-325.

17. BROWN (A.K.) and BURNETT (H.):

Studies on the neonatal development of the glucuronide
conjugating system.
J. Dis. Child, 1957, 94, 510-512.

18. BROWN (A.K.) and ZUELZER (W.W.):

Studies on the neonatal development of the glucuronide
conjugating system.
J. Clin. Invest., 1958, 37, 322-340.

19. BRUCE-CHWATT (L.J.):

Assessment of urinary excretion of antimalarial drugs
in large-scale chemotherapeutic eradication projects.
Bull. Org. mond. Santé, 1959, 20, 973-985.

20. BRUCK (C.G.) und KUHNE (L.):

Bestimmung der Eiweissbindung von Sulfonamiden Mittel
der Ultrafilters-Methode.
Arzneimittel Forsch. 1962, 12, 1116-1119.

21. BURGER (K.):

Dünnschichtchromatographische Methode zur Bestimmung
der Molgewichtsverteilung und des oxäthylierungsgrades
von Polyäthylenoxidverbindungen.
Z. analyt. Chem., 1963, 196, 259-262.

22. BURTON (A.F.) and KELSEY (F.E.):

The metabolism of Quinine in pregnancy animals.
J. Pharmacol., exp. Ther. 1943, 79, 70-76.

23. CANET (J.):

Les nouveaux antipaludiques de synthèse en Indochine.
Traitement curatif et préventif du paludisme par la
Nivaquine et la Paludrine.
Presse méd., 1949, 57, 1015-1017.

24. CANN (H.M.) and VERHULST (H.L.):

Fatal acute Chloroquine poisoning in children.
Pediatrics, 1961, 27, 95-102.

25. CASALIS (M.R.):

Dermite exfoliatrice généralisée avec chute de cheveux
et anémie après Nivaquine.
Bull. Soc. franç. Derm. Syph., 1960, 67, 484-485.

26. CHAMBON (M.):

Quelques modes de transformation des médicaments dans
l'organisme : la glycuconjugaison. Application à la
recherche de l'élimination des dérivés de la Morphine.
Atti del Dodicesimo Convegno Culturale e Professionale
dei Farmacisti dell' ALTA ITALIA - Pavia 11-12 maggio
1963.

27. CHAMBON (M.) et CHAMBON (P.):

Considérations sur de nouvelles méthodes de recherche de la Morphine au cours d'une expertise toxicologique.
Ann. Méd. lég. 1961, 41, 35-43.

28. CHAUDHURI (R.N.):

Treatment of malaria.
Indian med, Gaz., 1948, 83, 225-230.

29. CLARKE (E.G.C.):

A note on the identification on some antimalarial drugs.
J. Pharm.Pharmacol. 1958, 10, 194-196.

30. COHEN (Y.), PICHAT (L.), LACAPERE (J.) et VIAL (M.):

Etude du métabolisme des antipaludéens de synthèse au moyen d'un diphosphate de Chloroquine marqué au C₁₄.
Rev. Rhum., 1962, 29, 670.

31. CONN (H.L.), LURCHI (R.J.):

Some quantitative aspects of the binding of Quinidine and related Quinoline compound by human serum albumin.
J. Clin. Invest. 1961, 40, 509-516.

32. COVELL (S.G.), COATNEY (G.R.), FIELD (J.W.) and SINGH (J.):

La Chimiothérapie du Paludisme.
Monographie de O.M.S. N°27, Palais des Nations Genève 1956.

33. CRETIN (H.):

Etude du métabolisme et de l'élimination de l'Hydromorphone (Dilaudid) et de la Dihydrone (Eukodal)
Thèse de Doctorat en Pharmacie de l'Université de LYON, 1964.

34. DELBEC (M.):

Intoxication aiguë par la Chloroquine.
Thèse Médecine, Paris 1962.

35. DERIVAUX (J.) :

Obstétrique vétérinaire.
Vigot frères éd., Paris 1957.

36. DISCHE (Z.) :

A new specific color reaction of hexuronic acid.
J. Biol. Chem., 1947, 167 , 189-198.

37. DUCHESNAY (G.) :

Le risque thérapeutique. Prévention et traitement des accidents.
Doin éd., Paris 1954.

38. DUTTON (G.J.) :

Glucuronide conjugation.
First International Pharmacological Meeting. August 22-25, 1961.
Börje Uvnäs éd., Stockholm 1962.

39. ELLSWORTH (R.J.), ZELLER (R.W.) :

Chloroquine (Aralen) induced retinal damage.
Arch. Ophthalm., 1961, 66 , 269-272.

40. EPSTEIN (J.H.) :

Synthetic antimalarial drug therapy in lupus erythematosus and Polymorphous light eruptions.
Calif. Med. 1960, 92 , 135-138.

41. EYLES (D.E.), HOO (C.C.), WARREN (M.W.) and SANDOSHAM (A.A.):

Plasmodium falciparum resistant to Chloroquine in Cambodia.
Amer. J. trop. Med. Hyg., 1963, 12 , 840-843.

42. FISHMAN (W.H.), and GREEN (S.) :

Microanalysis of glucuronide glucuronic acid as applied to β -glucuronidase and glucuronic acid studies.
J. Biol. Chem., 1955, 215 , 527-537.

43. FLEXNER (L.B.) and POHL (H.A.):

Transfer of radioactive sodium across placenta of cat.
 Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1940, 44, 345-346.

44. FUHRMANN (G.):

Methode zur Bestimmung von Resochin in Harn.
 Z. Tropenmed. Parasit. , 1950, 2 , 279-287.

45. FUHRMANN (G.):

A field test for the estimation of Chloroquine in Urine.
 Bull. Wld. Hlth. Org., 1960, 22, 663-668.

46. FUHRMANN (G.):

Zum Nachweis von Antimalariamitteln in Körperflüssigkeiten und Ausscheidungen. I- Mitteilung. Ein verbesserter und vereinfachter Feldtest zur Bestimmung von Chloroquin (Resochin) im Urin.
 Z. Tropenmed. Parasit. , 1961, 12, 152-160.

47. FUHRMANN (G.) und KOENIG (K.):

Untersuchungen über die Resorptions und Ausscheidungsverhältnisse von Resotren, Resochin, und Yatren.
 Z. Tropenmed. Parasit. , 1953, 4 , 155-161.

48. FULD (H.):

Retinopathy following Chloroquine therapy.
 Lancet, 1959, 2 , 617.

49. GOLDMAN (L.), COLE (D.P.) and PRESTON (R.H.):

Chloroquine diphosphate in treatment of discoid lupus erythematosus.
 J. Amer. med. Ass., 1953, 152 , 1428-1429.

50. GOLDSTEIN (A.):

The interactions of drugs and plasma proteins.
 Pharmacological Reviews, 1949, 1 , 102-165.

51. GORDON (H.H.), DIEUAIDE (F.R.), MARBLE (A.), CHRISTIANSON (H.B.) and DAHL (L.K.):

Treatment of plasmodium vivax malaria of foreign origin:
a comparison of various drugs.
Arch. Intern. Med., 1947, 79, 365-380.

52. GRUPPER (C.):

Le traitement du lupus érythémateux par une association
d'antipaludiques de synthèse.
Thérapie, 1963, 18, 1177-1186.

53. HARRIS (F.C.):

Overdosage of Chloroquine.
Brit. med. J., 1957, 5050, 943.

54. HAYMAN (J.), MOST (H.), LONDON (I.M.), KANE (C.A.),
LAVIETES (P.H.) and SCHROEDER (E.F.):

Chloroquine (SN 7.618) a new highly effective antimalarial
drug for routine use in treatment of acute attacks of vivax
malaria.
Trans. Ass. Amer. Phycns, 1946, 59, 82.

55. HESS (M.E.) and SCHMIDT (C.F.):

Cardiovascular effects of Chloroquine with special reference
to its antifibrillatory action.
Circulat. Res., 1959, 7, 86.

56. HIRAKI (K.) and KIMURA (I.):

Studies on the treatment of malignant tumors with fibroblast-
inhibiting agent. III- Effects of Chloroquine on human cancers.
Acta Med. Okayama, 1964, 18, 71-82.

57. HOEKENGA (M.T.):

Treatment of malaria with a single dose of Amodiaquine or
Chloroquine.
J. Amer. med. Ass., 1952, 149, 1369-1371.

58. HOPKINSON (L.) and JACKSON (F.L.):

Effects of Chloroquine on growth and metabolism.
Nature (Lond.) 1964, 202, 27-29.

59. JAILER (J.W.), ROSENFELD (M.), and SHANNON (J.A.):

The influence of orally administered alkali and acid
on the renal excretion of Quinacrine, Chloroquine and
Santoquine.
J. Clin. Invest. 1947, 26, 1168-1172.

60. JEFFERY (G.M.):

Infectivity to mosquitoes of plasmodium vivax following
treatment with Chloroquine and other antimalarials.
Amer.J. Trop. Med. Hyg., 1958, 7, 207-211.

61. JELLIFFE (D.B.), JELLIFFE (E.F.P.):

The out-patient treatment of malaria with single dose
intramuscular in a hyperendemic area in West Africa.
Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg., 1953, 47, 235-238.

62. JINDAL (M.N.), PATEL (M.A.) and JOSEPH (A.D.):

Local anaesthetic action of antimalarials.
Arch. int. Pharmacodyn., 1960, 127, 132-140.

63. JOHNSON (W.S.) and BUELL (B.G.):

A new synthesis of Chloroquine.
J. Amer. chem. Soc., 1952, 74, 4513-4516.

64. JUNEMANN (C.), VERDAGUEZ (J.), PERALES (J.), LIRA (C.),
DOMINGUEZ (J.P.) y OROZCO (R.):

Lesiones corneales. Asociadas a la administracion de
Cloroquina y otros antimalaricos.
Rev. méd. Chile, 1962, 90, 344-347.

65. KENYON (R.L.), WIESNER (J.A.) and KWARTLER (C.E.):

Chloroquine manufacture.
Ind. Eng. Chem., 1949, 41, 654-662.

66. KIPPING (F.S.) and POPE (W.J.):

Studies of the Terpens and allied compounds. The sulphonic derivatives of camphor. Part I.
J. chem. Soc., 1893, 63, 548-604.

67. KJAER (K.):

Effects on an overdose of Chloroquine in a pregnant woman.
Amer.J. trop. Med. Hyg., 1955, 4, 259-262.

68. KURODA (K.):

Detection and distribution of Chloroquine metabolites in human tissues.
J. Pharmacol. exp. Ther., 1962, 137, 156-161.

69. LACAPERE (J.), DELAVILLE (G.) et BONHOMME (F.):

Etude sur l'emploi et le mode d'action des antipaludéens de synthèse. Répartition des amino-quinoléines dans les différents tissus.
Rev. Rhum., 1962, 29, 252-257.

70. LARRIBAUD (J.), COLONNA (P.), CHEVEL (M.) et ROMANI (B.):

Intoxication aiguë par la Chloroquine absorbée par voie orale. A propos de deux observations.
Presse méd., 1961, 69, 2193-2196.

71. LE BRETON (R.) et GARAT (J.):

Détection rapide des dérivés de la quinoléine au cours des intoxications.
Rev. Lyon Méd., 1962, 11, 479-481.

72. LECOMTE (J.):

Pouvoir de libération de l'histamine par la Chloroquine.
C.R. Soc. Biol. 1955, 149, 1693-1695.

73. MAIER (J.):

A field trial of Chloroquine (SN 7.618) as a suppressive against malaria in the Philippines.
 Amer.J. trop. Med. Hyg., 1948, 28, 407-412.

74. MARKOWITZ (H.A.) and Mc GINLEY (J.M.):

Chloroquine Poisoning in a child.
 J. Amer. med. Ass. 1964, 189, 950-951.

75. MASON (J.R.):

Fatal Chloroquine poisoning : two more cases.
 J. Amer. med. Ass. 1964, 188, 187.

76. Mc CHESNEY (E.W.), BANKS (W.J.), and Mc AULIFF (J.P.):

Laboratory studies of the 4-aminoquinoline antimalarials. II- Plasma levels of Chloroquine and Hydroxy chloroquine in man after various oral dosage regimens.
 Antibiot. and Chemother. , 1962, 12, 583-594.

77. Mc CHESNEY (E.W.) and Mc AULIFF (J.P.):

Laboratory studies of the 4-aminoquinoline of Chloroquine, Hydroxy chloroquine and SN 7718.
 Antibiot. and Chemother. , 1961, 11, 800-810.

78. Mc CHESNEY (E.W.), Mc AULIFF (J.P.), SURREY (A.R.) and OLIVET (A.J.):

Observations on the metabolism of Chloroquine and Hydroxychloroquine.
 Fed. Proc., 1954, 13, 97.

79. Mc CHESNEY (E.W.), NACHOD (F.C.) and TAINTER (M.L.):

Rationale for the treatment of lupus erythematosus with antimalarials.
 J. invest. Derm. , 1957, 29, 97-104.

80. Mc CHESNEY (E.W.), WYZAN (H.S.) and Mc AULIFF (J.P.):

The determination of 4-aminoquinoline antimalarials:
Revaluation of the induced fluorescence method, with
specific application to hydroxychloroquine analysis.
J. Amer.pharm. Ass., sci.Ed. , 1956, 45, 640-645.

81. MERGER (R), LEVY (J.) et MELCHIOR (J.):

Précis d'obstétrique.
Masson éd., Paris 1961.

82. MERCK INDEX . 7^e édition.

Merck-Rahway éd., U.S.A., 1960.

83. MERVIN (C.F.), and WINKELMANN (R.K.):

Dermatologic clinics. Antimalarial drugs in the therapy
of lupus erythematosus.
Proc. Mayo Clin., 1962, 37, 253-268.

84. MONNET (R.), BOITEAU (H.) et MOUSSION (C):

Identification et dosage de la chloroquine dans les
milieux biologiques par spectrophotométrie dans l'ultra-
violet.
Ann. Biol. clin., 1964, 22, 429-434.

85. MONNET (R.) et VIALA (A.):

Recherche toxicologique de la Chloroquine par chroma-
tographie sur papier.
IX^e Congrès des Sociétés de Pharmacie de France,
7, 8 et 9 Juin 1957 - Clermont-Ferrand.

86. MOST (H.), LONDON (I.M.), KANE (C.A.), LAVIETES (P.H.)
SCHROEDER (E.F.) and HAYMAN (J.M.):

Chloroquine for treatment of acute attacks of vivax
malaria.
J. Amer. med. Ass., 1946, 131, 963-967.

87. MOYA (F.) and THORNDIKE (V.):

Passage of drugs across the placenta.
 Amer.J. Obstet. Gynec., 1962, 84 (2), 1778-1795.

88. MUNIER (R.):

Séparation des alcaloïdes de leur N-oxydes par micro-
 chromatographie sur papier.
 Bull. Soc. Chim. Biol.(Paris), 1953, 35, 1225-1231.

89. MUNIER (R.), et MACHEBOEUF (M.):

Microchromatographie de partage sur papier des alcaloïdes
 et de diverses bases azotées biologiques. III- Exemples
 de séparations de divers alcaloïdes par la technique en
 phase solvant acide.
 Bull. Soc. Chim. Biol.(Paris), 1951, 33, 846-856.

90. NICOL (L.), GIRARD (O.), CORVAZIER (R.), CHEYROUX (M.) ,
 RECOLARD (P.) et SIZARET (P.):

Etude comparée de la transmission de l'immunité des
 mères aux nouveaux-nés.
 Rev. Immunol.(Paris), 1960, 24, 16-23.

91. OLIVIER (H.), ROBERT (F.), HELVADJIAN (G.) et QUICKE (J.):

Intoxication suicidé par la Nivaquine.
 Ann. Méd. lég. 1958, 38, 306-307.

92. PAULINI (E.):

Spectrophotometrical determination of Chloroquine
 Rev. bras. . Malar., 1955, 7, 329-332.

93. PILLE (G.), LABEGORRE (J.), LAMBOURG (J.), et LUNVEN (P.):

Intoxications volontaires à la Chloroquine à Dakar
 (Sénégal).
 Méd. trop., 1958, 18, 305-311.

94. PILLE (G.), et LAMBOURG (J.):

Note de laboratoire sur la recherche, la caractérisation et le dosage de la Chloroquine dans les liquides biologiques et les tissus.
Méd. trop., 1958, 18, 311-313.

95. PILLSBURY (D.M.) and JACOBSON (C.):

Treatment of chronic discoid lupus erythematosus with Chloroquine (Aralen).
J. Amer. med. Ass., 1954, 154, 1330-1333.

96. POLONOVSKI(M.) et POLONOVSKI (M.):

Sur les aminoxydes . XII- N-oxyde de Spartéine.
Bull. Soc. chim. Fr. , 1936, 3 , 891-898.

97. POPE (W.J.) and PEACHEY (S.J.):

The resolution of Tetrahydropapaverine into its optically active components. Constitution of Papaverine.
J. chem. Soc., 1898, 73 , 892-902.

98. POWELL (R.D.), BREWER (G.J.), ALVING (A.S.) and MILLAR (J.W.):

Studies on a strain of Chloroquine-resistant plasmodium falciparum from Thailand.
Bull. Wld Hlth Org., 1964, 30 , 29-44.

99. POWELL (R.D.), BREWER (G.J.), DEGOWIN (R.L.) and ALVING (A.S.)

Studies on a strain of Chloroquine-resistant plasmodium falciparum from Vietnam.
Bull. Wld Hlth Org., 1964, 31 , 379-392.

100. PROUTY (R.W.) and KURODA (K.):

Spectrophotometric determination and distribution of Chloroquine in human tissues.
J. Lab. clin. Med., 1958, 52 , 477-480.

101. RANDERATH (K.):

Chromatographie sur couches minces.
Gauthier-Villars éd., Paris 1964.

102. RIEGEL (B.) and SHERWOOD (L.T.):

The resolution of Chloroquine SN 7.618.
J. Amer.chem. Soc., 1949, 71 , 1129-1130.

103. ROBERTS (S.J.):

Veterinary obstetrics and Genital diseases.
Ithaca éd., New-York 1956.

104. RUBIN (M.), BERNSTEIN (H.N.) and ZVAIFLER (N.J.):

Studies on the pharmacology of Chloroquine.
Arch. Ophthal. 1963, 70 , 474-481.

105. SATALINE (L.R.) and FARMER (H.):

Impaired vision after prolonged Chloroquine therapy.
New Engl. J. Med., 1962, 266 , 346-347.

106. SCHNEIDER (M.J.), DARBON (A.), HAMBURGER (J.) et PEQUIGNOT(H.):

Traitement actuel du paludisme.
Presse méd., 1964, 72 , 1073-1078.

107. SCHOLTAN (W.) und SCHMID (J.):

Die Bindung der Penicilline and die Eiweisskörper des
Serums und des Gewebes.
Arzneimittel Forsch., 1962, 12 , 741-750.

108. SCOTT (V.):

Single intravenous injections of Chloroquine in the
treatment of Falciparum malaria: toxic and immediate
therapeutic effects in 110 cases.
Amer. J. trop. Med. Hyg., 1950, 30 , 503-510.

109. SEEGER (W.H.):

A convenient arrangement for rapid dialysis.
J. Lab. clin. Med., 1943, 28 , 897-898.

110. SEIBERT (R.A.), WILLIAMS (C.E.) and HUGGINS (R.A.):

The isolation and identification of "Bound" Morphine.
Science, 1954, 120 , 222-225.

111. SHAFFER (B.), CAHN (M.M.) and LEVY (E.J.):

Absorption of antimalarial drugs in human skin ;
spectroscopic and chemical analysis in epidermis and
corium.
J. Invest. Derm. ., 1958, 30 , 341-345.

112. SMITH (J.N.) and WILLIAMS (R.T.) :

cité par WILLIAMS (R.T.) dans Detoxication Mechanisms.
Chapman & Hall éd., London 1959.

113. SNOECK (J.):

Le placenta humain.
Masson éd., Paris 1958.

114. SOARES (R.):

Concentration and elimination of Chloroquine through
placental circulation and by mother milk in patients
on a chloroquine salt diet.
Rev.Quim. Farm. Rio de I. 1957, 22 , 33-39.

115. SPECIA :

Notes techniques.

116. SPICKNALL (C.G.), TERRY (L.L.), and COATNEY(G.R.):

The treatment of falciparum malaria with intramuscular
chloroquine.
Amer. J. méd. Sci., 1949, 218 , 374-377.

117. STEPAN (J.), and KAKAC (B.):

Determination of Chloroquine in urine by U.V. spectrography and the types of spectra after intravenous infusion. Med. exp.(Basel), 1964, 11, 352-358.

118. STERNBERG (T.H.) and LADEN (E.):

Discoid lupus erythematosus : bilateral macular degeneration due to Chloroquine. Arch. Derm. , 1959, 79, 116-118.

119. STRUFE (R.):

Eine Kolorimetrische Bestimmungsmethode für Resochin. Clin. chim. Acta., 1960; 5 , 753-756.

120. SURREY (A.R.) and HAMMER (H.F.):

Some 7-substituted 4-aminoquinoline derivatives. J. Amer.chem. Soc., 1946, 68, 113-116.

121. THORP (J.M.):

The influence of Plasma proteins on the action of drugs; pages 64-76, dans "Absorption and distribution of drugs". Livingstone éd., Edinburgh and London 1964.

122. TITUS (E.O.), CRAIG (L.C.), GOLUMBIC (C.), MIGHTON (H.R.), WEMPEN (I.M.) and EIDERFIELD (R.C.):

Identification by distribution studies: IX- Application to metabolic studies of 4-aminoquinoline antimalarials. J. Org. Chem., 1948, 13, 39-62.

123. TRUHAUT (R.):

Rôle de transport des protéines plasmatiques pour les toxiques.
Vè Symposium Ouest-européen de Chimie clinique,
Paris 12-13 Avril 1965.

124. VAHLQUIST (B.):

Transfert de l'immunité de la mère à l'enfant par la voie transplacentaire et par l'allaitement.
Rev. Immunol.(Paris), 1960, 24, 3-12.

125. VANDEN HEUVEL (W.J.A.), HAAHTI (E.O.A.) and HORNING (E.C.):

Gas chromatographic separations of drugs and drug metabolites.
Clin. Chem., 1962, 8, 351-359.

126. VYKYDAL (M.), JORDA (V.), OBRUCNICK (M.) et SVEC (V.):

Etude sur l'emploi clinique et le mode d'action des antipaludéens (chloroquine) en dehors de leurs indications chimiothérapeutiques.
Tunis méd., 1962, 40, 471-477.

127. WILLIAMS (R. T.):

Detoxication mechanisms.
Chapman & Hall éd., London 1959.

128. WISELOGLE (F.Y.):

Cité par BERTAGNA (P.)
Bull. Wld Hlth. Org., 1951, 4, 267-281.

129. WOODS (L.A.):

Distribution and fate of Morphine in non-tolerant dogs and rats.
J. Pharmacol. exp. Ther., 1954, 112, 158-175.

130. WOODS (L.A.):

Identification of Morphine glucuronide as metabolite in dog bile and urine.
Fed. Proc., 1954, 13, 419.

131. WOODS (L.A.), COCHIN (J.), FORNEFELD (E.G.) and SEEVERS (M.H.):

Estimation of Morphine in biological materials.
J. Pharmacol. exp. Ther., 1954, 111, 64-73.

132. YOUNG (M.D.), CONTACOS (P.G.), STITCHER (J.E.) and MILLAR (J.W.)

Drug resistance in Plasmodium falciparum from Thailand.
Amer. J. trop. Med. Hyg., 1963, 12, 305-314.

133. ZELLER (R.W.) and DEERING (D):

Corneal complication of Chloroquine (Aralen) phosphate therapy.

J. Amer. med. Ass., 1958, 168, 2263.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
 <u>PREMIERE PARTIE - TRAVAUX ANTERIEURS</u>	11
 <u>CHAPITRE I</u>	
I - Historique de la Chloroquine	13
II - Synthèse de la Chloroquine	15
III - Propriétés physico-chimiques	21
 <u>CHAPITRE II</u>	
I - Indications thérapeutiques	25
II - Toxicité de la Chloroquine	29
A - Toxicité aiguë	29
B - Toxicité chronique	33
C - Propriétés pharmacodynamiques secondaires	34
III - Métabolisme de la Chloroquine	37
A - Transformation dans l'organisme	38
B - Glycuroconjugaison	40
C - Absorption et excrétion	41
D - Taux plasmatique	42
E - Distribution	42
 <u>CHAPITRE III</u>	
I - Séparation et Identification de la Chloroquine . . .	45
A - Séparation	45
B - Réactions et tests d'identification	47
II - Dosage de la Chloroquine	49

DEUXIEME PARTIE - TRAVAUX PERSONNELS 51

CHAPITRE I : Métabolisme et élimination de la

Chloroquine	53
I - Etude des méthodes de dosage	53
A - Méthode de M. et P. CHAMBON	54
B - Méthode spectrophotométrique	61
C - Méthode de STAS-OTTO-OGIER	64
II - Expérimentation chez le chien	67
A - Dosage de la Chloroquine dans les urines et dans les organes	67
- Chien I: Intoxication suraiguë	67
- Chien II: Intoxication aiguë	72
- Chien III: Intoxication aiguë	75
1) Etude de la répartition de la Chloroquine chez l'animal gravide . .	76
2) Etude de la réabsorption intestinale .	79
3) Etudes comparées des méthodes de dosage	81
B - Identification de la Chloroquine dans les urines et dans les organes	84
1) Isolement de la Chloroquine	84
2) Problème d'altération des alcaloïdes par les oxydants des solvants	85
3) Identification par chromatographie sur papier	86
4) Identification par chromatographie sur couches minces	89
C - Identification du dérivé de conjugaison de la Chloroquine dans les urines	97
1) Isolement du dérivé conjugué	97
2) Identification de la forme conjuguée	99

<u>CHAPITRE II</u> : Etude de la liaison de la Chloroquine	
aux protéines plasmatiques	103
A - Dialyse dynamique	109
B - Dialyse statique	112

<u>CHAPITRE III</u> : Etude du dédoublement des antipodes	
optiques de la Chloroquine	115

<u>CHAPITRE IV</u> : Etude du passage à travers le placenta	
de la Chloroquine et de ses dérivés	121

TROISIEME PARTIE -

Discussion	131
Conclusions	147
BIBLIOGRAPHIE	153

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

ETUDES DU MECANISME DE LA TERATOGENESE PROVOQUEE PAR

LE THALIDOMIDE
